

REGINA MARIA SANTOS DE AMORIM

**VARIABILIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA HEPATITE C EM PACIENTES EM
HEMODIÁLISE NO BRASIL CENTRAL**

Brasília, 2009

REGINA MARIA SANTOS DE AMORIM

**VARIABILIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA HEPATITE C EM PACIENTES EM
HEMODIÁLISE NO BRASIL CENTRAL**

**Tese apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília,
como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em
Ciências da Saúde.**

Orientadoras: Prof^ª. Dra. Regina Maria Bringel Martins

Prof^ª. Dra. Cláudia Renata Fernandes Martins (*in memoriam*)

Brasília, 2009

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA HEPATITE C EM PACIENTES EM
HEMODIÁLISE NO BRASIL CENTRAL**

Regina Maria Santos de Amorim

Orientadoras: Prof^a. Dra. Regina Maria Bringel Martins

Prof^a. Dra. Cláudia Renata Fernandes Martins (*in memoriam*)

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Elisabeth Lampe – Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves – Universidade de Brasília

Prof^a. Dra. Andréa Maranhão – Universidade de Brasília

Prof^a. Dra. Loreny Giugliano – Universidade de Brasília

Prof^o. Dr. Marcelo de Macedo Brígido – Universidade de Brasília

Brasília, 2009

Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.

Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.

(Antonie de Saint Exupéry)

À Profª Cláudia Renata Fernandes Martins

Meu agradecimento póstumo a quem tive a sorte e a honra de ter sido orientada no mestrado e que me ensinou o caminho para a realização da pesquisa que resultou na tese de doutorado apresentada e a quem considero minha guia na Virologia.

A convivência que tive com a professora Cláudia possibilitou a construção de laços afetivos fortes, e sua perda inesperada trouxe a sensação de vazio. Porém, no tempo em que tive a oportunidade de conviver com ela profissionalmente, pude perceber a grande amiga e companheira que tinha, além de educadora, pesquisadora e uma pessoa dedicada às causas da instituição e das pessoas.

Tive a oportunidade de ter Cláudia como professora e amiga, infelizmente, muito curta, porém ficou sua sabedoria, seus ensinamentos, sua persistência, sua coragem, sua forma de aceitar a vida e sua imensa vontade de viver.

Obrigada Cláudia, por tudo que você me ensinou.

Aos meus pais, Adelina e Aníbal (*in memoriam*) que iluminaram meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: o estudo

Dedico esse momento feliz aos meus netinhos Artur e Catarina e ao meu marido, José Maria, meus filhos, Alexandre, Frederico, Felipe e Ana Carolina, que sempre confiaram em meus sonhos e me incentivaram a acreditar que é possível realizá-los.

Aos pacientes que anonimamente colaboraram para a minha pesquisa.

Agradecimentos

À Prof^a. **Regina Maria Bringel Martins**, minha orientadora, pela paciência e sutileza nas orientações e sugestões, pela confiança em mim depositada e pela amizade. Sem a sua ajuda este momento não seria possível.

À amiga **Tainá Raiol**, pela sua amizade, paciência, incentivo, apoio e preocupação nos momentos de dúvida e de crise. Serei sempre grata por sua atenção e presteza com que sempre atendeu minhas solicitações. Sua ajuda foi muito importante para conclusão deste trabalho.

À amiga **Geni Neumann Noceti de Lima Câmara**, pela amizade e por ter sido a primeira pessoa a acreditar em mim e que me encorajou na busca dos meus ideais.

Aos meus amigos, **Claudiner Oliveira, Tainá Raiol, Patrícia Wyant, Eduardo Ramalho, Daniela Cerqueira, Daniella Souza, Natália Milanezi, Verônica Veras, Nazle Véras, Margareti Medeiros, Érico Diansi, Márcio Rojas**, do grupo de Virologia Humana da UnB. Com o apoio de todos vocês tive forças para seguir, pois sempre fizeram presentes na busca da minha conquista. Obrigado amigos do grupo pelos momentos de aprendizado, pelo incentivo, pelos momentos de alegrias, risos e lágrimas.

Ao Prof. **Marcelo de Macedo Brígido**, a Prof^a **Sônia Bão** e a Prof^a **Marisa Ferreira**, pela amizade, disponibilidade, e pelo apoio essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a **Elisabeth Lampe**, a Prof^a **Andréa Maranhão**, a Prof^a **Loreny Giugliano**, ao Prof^o **Francisco de Assis Rocha Neves** e ao Prof^o **Marcelo de Macedo Brígido**, membros da banca examinadora, pelas valiosas e oportunas considerações na análise deste trabalho.

À Prof^a **Marisa Ferreira** e a todos os professores e funcionários do Laboratório de Fitopatologia, pela receptividade e pela cordial convivência diária.

Ao **Dr. José Eduardo Trevizoli**, do Hospital de Base, e a Dra. **Lara Velasco**, do Laboratório Sabin, pela contribuição importante para a realização deste trabalho.

Ao Prof^o **Alexandre Coelho**, pela contribuição na análise dos resultados.

Ao meu filho **Felipe**, pela grande ajuda na formatação final do trabalho e a sua namorada, **Isabel Scafuto** pela ajuda na tradução do abstract.

À amiga **Carmem Luci Rodrigues Lopes** pela disponibilidade e colaboração na parte final do trabalho.

A **Edigrês Alves** e **Shirleide Ribeiro**, funcionárias da secretaria da Pós-Graduação em Ciências da Saúde, que sempre me atenderam com cordialidade e eficiência.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde** da Universidade de Brasília facilitador da realização deste doutorado.

Aos **meus familiares e amigos**, pelo grande incentivo.

SUMÁRIO

Resumo	xi
Abstract	xii
Índice de Figuras	xiii
Índice de Quadros	xiv
Índice de Tabelas	xv
Lista de Siglas e Abreviaturas	xvi
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 O Vírus da Hepatite C (Hepatitis C virus – HCV)	17
1.1.1 <i>Classificação e estrutura da partícula viral</i>	17
1.1.2 <i>Variabilidade do vírus da hepatite C</i>	21
1.1.3 <i>Ciclo de replicação do vírus da hepatite C</i>	23
1.2 Epidemiologia da Infecção pelo Vírus da Hepatite C	25
1.2.1 <i>Transmissão</i>	25
1.2.2 <i>Prevalência</i>	26
1.2.3 <i>Distribuição geográfica dos genótipos</i>	28
1.3 Diagnóstico da Infecção pelo Vírus da Hepatite C	30
1.4 Patogenia e Aspectos Clínicos da Infecção pelo Vírus da Hepatite C	35
1.5 Resposta Imune e Persistência do Vírus da Hepatite C	37
1.6 Tratamento do Vírus da Hepatite C	38
1.7 Hepatite C em Pacientes Renais Crônicos	40
1.8 Justificativa	44
2. OBJETIVOS	46
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Pacientes Estudados	47
3.2 Amostras Testadas	47
3.3 Extração do RNA	48
3.4 Transcrição Reversa	48
3.5 Reação em Cadeia da Polimerase	48
3.6 Sequenciamento	51
3.6.1 <i>Precipitação dos produtos de PCR</i>	51
3.6.2 <i>Sequenciamento automático</i>	51
3.6.3 <i>Análise das seqüências</i>	52
3.6.4 <i>Análise filogenética</i>	52
3.7 Clonagem	53
3.8 Análise das Quasispecies do HCV	53
3.9 Análise da Variabilidade Genética	54
3.10 Análise das Substituições Não Sinônimas e Sinônimas	54
3.11 Análise Filogenética	55
3.12 Análise Estatística	55

4. RESULTADOS	56
4.1 Genotipagem do HCV em pacientes em hemodiálise no Distrito Federal.....	56
4.1.1 <i>Deteccção do RNA HCV</i>	56
4.1.2 <i>Genotipagem do HCV</i>	57
4.2 Variabilidade Genética do HCV	59
4.2.1 <i>Amplificação de HVR1</i>	59
4.2.2 <i>Caracterização da variabilidade genética do HCV em pacientes em hemodiálise (Grupo IRC)</i>	60
4.2.3 <i>Caracterização da variabilidade genética do HCV nos pacientes com hepatite C crônica (Grupo controle)</i>	64
4.2.4 <i>Comparação da variabilidade genética de HVR1 do HCV entre o grupo de pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) e o grupo com infecção crônica pelo HCV (controle)</i>	67
5. DISCUSSÃO	74
5.1 <i>Caracterização molecular do HCV em pacientes em hemodiálise no Distrito Federal</i>	74
5.2. <i>Diversidade genética em HVR1 do HCV nos grupos IRC e controle</i>	76
6. CONCLUSÕES	82
7. BIBLIOGRAFIA	83
8. ANEXOS	97

Resumo

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) ocorre com freqüência elevada em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) em hemodiálise. O objetivo deste estudo foi caracterizar a variabilidade genética do HCV circulante em pacientes em hemodiálise no Brasil Central. Na primeira etapa deste estudo, os genótipos e subtipos do HCV foram identificados em pacientes em hemodiálise no Distrito Federal. Para tal as regiões 5' UTR e NS5B do genoma viral foram amplificadas e sequenciadas. Cinquenta e uma amostras de soro foram RNA HCV positivas para 5' UTR e, destas, 42 (82,3%) para NS5B. Pelo seqüenciamento da região 5' UTR, os genótipos 1 e 3 foram encontrados, sendo o subtipo 1a o mais prevalente (82,3%), seguido dos subtipos 1b (5,9%), 1a/1b (2,0%) e 3a (9,8%). O subtipo 1a também foi o mais freqüente (90,5%) para a região NS5B, seguido do subtipo 3a (9,5%). A concordância da genotipagem para as duas regiões foi de 100% para os genótipos, e de 92,5% para os subtipos. Na segunda etapa deste trabalho, foi comparada a variabilidade genética da região hipervariável (HVR1) do HCV em um grupo de pacientes em hemodiálise anti-HCV negativos, RNA HCV positivos (grupo IRC) e em um grupo de pacientes com hepatite C crônica anti-HCV e RNA HCV positivos, sem tratamento (controle). Para isso, 10 amostras de cada grupo foram amplificadas para a região HVR1, clonadas e seqüenciadas. O grupo controle apresentou uma maior freqüência de sítios variáveis em HVR1 (83,9% x 59,3%, $p < 0,05$), bem como uma maior diversidade entre as amostras e entre as *quasispecies* (intra-paciente), comparadas ao grupo IRC. Além disso, foi verificada uma maior variabilidade dos aminoácidos nas posições 1(384), 3(386), 8(391), 11(394), 14(397), 15(398), 17(400), 22(405) e 27(410) no grupo controle, em relação ao grupo IRC, que mostrou maior variabilidade somente na posição 5(388) ($p < 0,05$). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre a razão das taxa de substituições não sinônimas e sinônimas dos grupos IRC e controle, sugerindo uma pressão seletiva similar pelo sistema imune sobre as populações virais nestes grupos. O perfil hidropático dos aminoácidos de HVR1 do HCV nos dois grupos analisados revelou-se similar, e as variações nas cargas foram limitadas a sítios específicos. Concluindo, estes dados mostram uma menor variabilidade genética na HVR1 do HCV em pacientes em hemodiálise anti-HCV negativos e RNA positivos (grupo IRC), quando comparados aos indivíduos do grupo controle, que pode estar associada à imunossupressão.

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) infection occurs with high frequency in chronic renal failure (IRC) patients on hemodialysis. The aim of this study was to characterize the genetic variability of circulating HCV in hemodialysis patients in Central Brazil. In the first part of this study, HCV genotypes and subtypes were determined in hemodialysis patients in the Federal District. For this, 5' UTR and NS5B regions of viral genome were amplified and sequenced. Fifty-one serum samples were HCV RNA positive for 5' UTR, and of these, 42 (82,3%) for NS5B. By the sequencing of the 5' UTR region, genotype 1 and 3 were found, being subtype 1a the most prevalent (82,3%), followed by subtypes 1b (5,9%), 1a/1b (2,0%) and 3a (9,8%). The subtype 1a was also the most frequent (90,5%) for the NS5B region, followed by subtype 3a (9,5%). The concordance of genotyping for the two regions was of 100% for the genotypes, and of 92,5% for the subtypes. In the second part of this study, the genetic variability within hypervariable region 1 (HVR1) of the HCV was compared in a group of hemodialysis patients who were anti-HCV negative and HCV RNA positive (group IRC) and a group of untreated patients with HCV chronic infection who were anti-HCV and HCV RNA positive (control). For this, 10 samples from each group were amplified for the HVR1 region, cloned and sequenced. The control group had a higher frequency of variable sites in HVR1 (83,9% x 59,3%, $p < 0,05$) as well as a greater diversity within (intra-patient) and among the samples, compared to the IRC group. Moreover, it was observed a greater variability of amino acids in positions 1 (384), 3 (386), 8 (391), 11 (394), 14 (397), 15 (398), 17 (400), 22 (405) and 27 (410) in the control group, than in the IRC group, which showed a greater variability only in position 5 (388) ($p < 0,05$). On the other hand, there was no statistically significant difference between the ratio of the rates of non-synonymous and synonymous substitutions of the IRC and control groups, suggesting a similar selective pressure by the immune system on viral populations in the groups. The hydrophobic profile of the amino acids in the HVR1 of HCV in the two analyzed groups revealed to be similar, and variations in charges were limited to specific sites. In conclusion, these data show a lower genetic variability within the hypervariable region 1 (HVR1) of HCV in the hemodialysis patients who were anti-HCV negative and HCV RNA positive (group IRC), when compared with individuals in the control group, which may be associated to their immunosuppression.

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática do vírus da hepatite C.....	16
Figura 2: Representação esquemática da organização do genoma e das proteínas do vírus da hepatite C.....	17
Figura 3: Filogenia do HCV. Análise filogenética dos diferentes genótipos do HCV.....	21
Figura 4: Estimativa da prevalência da infecção pelo vírus da hepatite C no mundo....	26
Figura 5: Distribuição dos genótipos do HCV nas diferentes regiões do Brasil.....	28
Figura 6: Curso da infecção aguda pelo HCV.....	29
Figura 7: Curso da infecção aguda, evoluindo para infecção crônica pelo HCV.....	30
Figura 8: Esquema da história natural da infecção pelo vírus da hepatite C.....	36
Figura 9: Soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite C em pacientes em hemodiálise, baseada em dados publicados desde 1999.....	39
Figura 10: Amplificação das regiões 5' UTR e NS5B do HCV.	55
Figura 11: Análise filogenética da região NS5B do HCV em amostras de pacientes em hemodiálise no Distrito Federal.....	57
Figura 12: Amplificação da região do envelope do HCV.....	58
Figura 13: Seqüências de nucleotídeos de HVR1 do HCV das 10 amostras dos pacientes renais crônicos anti-HCV negativos (Grupo IRC).....	60
Figura 14: Alinhamento das seqüências de aminoácidos de HVR1 do HCV deduzidas das 10 amostras dos pacientes renais crônicos (Grupo IRC).....	61
Figura 15: Seqüências de nucleotídeos de HVR1 do HCV das 10 amostras do grupo de pacientes com infecção crônica pelo HCV (controle).....	64
Figura 16: Seqüências de aminoácidos de HVR1 do HCV deduzidas das 10 amostras do grupo de pacientes com infecção crônica (controle).....	65
Figura 17: Análise filogenética dos grupos IRC e do grupo controle.....	68
Figura 18: Freqüência de clones com variações de aminoácidos na região HVR1 do HCV entre os grupos paciente renal crônico (IRC) e controle.....	71
Figura 19: Gráfico de entropia de Shannon calculada para HVR1 do HCV nos grupos paciente renal crônico (IRC) e controle.....	72
Figura 20: Comparação dos resíduos de aminoácidos de HVR1 do HCV entre o grupo paciente renal crônico (IRC) e o grupo controle.....	73

Índice de Quadros

Quadro 1: Estudos de prevalência da infecção pelo vírus da hepatite C em pacientes em hemodiálise no Brasil.....	40
Quadro 2: Seqüência dos iniciadores usados para amplificação da região 5'UTR do genoma do HCV.....	48
Quadro 3: Seqüência de iniciadores usados para amplificação da região NS5B do genoma do HCV.....	49
Quadro 4: Seqüência dos iniciadores usados para amplificação da região E2 do genoma do HCV.	49

Índice de Tabelas

Tabela 1: Genotipagem do HCV pelo seqüenciamento das regiões 5' UTR e NS5B em pacientes em hemodiálise no DF.....	56
Tabela 2: Freqüência de aminoácidos presentes em cada posição de HVR1 do HCV nas seqüências analisadas do grupo IRC.....	62
Tabela 3: Freqüência de aminoácidos presentes em cada posição de HVR1 do HCV HCV nas seqüências analisadas do grupo controle.....	66
Tabela 4: Comparação de sítios polimorficos entre o grupo de IRC e o grupo controle	69
Tabela 5: Análise da diversidade genética de HVR1 do HCV entre os grupos paciente renal crônico (IRC) e controle.....	69
Tabela 6: Comparação da média das substituições não sinônimas e sinônimas em HVR1 do HCV entre os grupos paciente renal crônico (IRC) e o grupo controle.....	70

Lista de Siglas e Abreviaturas

- ALT – Alanina aminotransferase
- ARF – Fase alternativa de leitura (*alternative reading frame*)
- ARF-P – Proteínas de quadro de leitura alternativo (*alternative reading frame proteins*)
- BLAST – Ferramenta básica de alinhamento local (*Basic Local Alignment Search Tool*)
- ELISA – Ensaio imunoenzimático
- HBsAg - Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
- HCV – Vírus da Hepatite C
- HCVcc – Partículas infecciosas do vírus da hepatite C
- HCVpp – Pseudopartículas de retro- e lentivírus
- HIV-1 – Vírus da imunodeficiência humana
- HVR – Regiões hipervariáveis (*hypervariable region*)
- ICTV – Comitê Internacional de taxonomia dos vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*)
- IRC – Insuficiência renal crônica
- IRES – Sítio Interno de entrada ribossomal (*internal ribosome entry site*)
- ISDR – Região determinante de sensibilidade ao interferon (*interferon sensitivity determining region*)
- LDL – Lipoproteína de baixa densidade (*low-density lipoprotein*)
- ORF – Fase aberta de leitura (*open reading frame*)
- PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
- PEG-INF – Interferon pegilado
- PKR – Proteína quinase celular
- RdRP – RNA polimerase dependente de RNA
- RFLP – Análise de polimorfismo dos fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphism*)
- UTR – Região não traduzida (*untranslated region*)
- WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

1. INTRODUÇÃO

A partir da caracterização do genoma do vírus da hepatite C (HCV) em 1989 por Choo *et al.*, esse patógeno foi identificado como sendo o principal agente etiológico das hepatites pós-transfusionais não-A não-B (Choo *et al.*, 1989).

Atualmente, estima-se que cerca de 130 milhões de pessoas estejam infectadas com o HCV, correspondendo aproximadamente a 2,2% da população mundial (Alter, 2007). A persistência da infecção está associada com o desenvolvimento de hepatite crônica, cirrose e hepatocarcinoma. Aproximadamente 75% a 85% dos indivíduos infectados desenvolvem infecção crônica (Chen & Morgan, 2006).

1.1 O Vírus da Hepatite C (*Hepatitis C virus – HCV*)

1.1.1 Classificação e estrutura da partícula viral

O HCV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus* (ICTV, 2006). A partícula viral apresenta aproximadamente 60 nm de diâmetro. Além do capsídeo de simetria icosaédrica, esse vírus possui um envelope lipídico e, como material genético, RNA de fita simples positivo com aproximadamente 9000 nucleotídeos (nt) (Chevaliez & Pawlotsky, 2007). A Figura 1 ilustra a partícula do HCV.

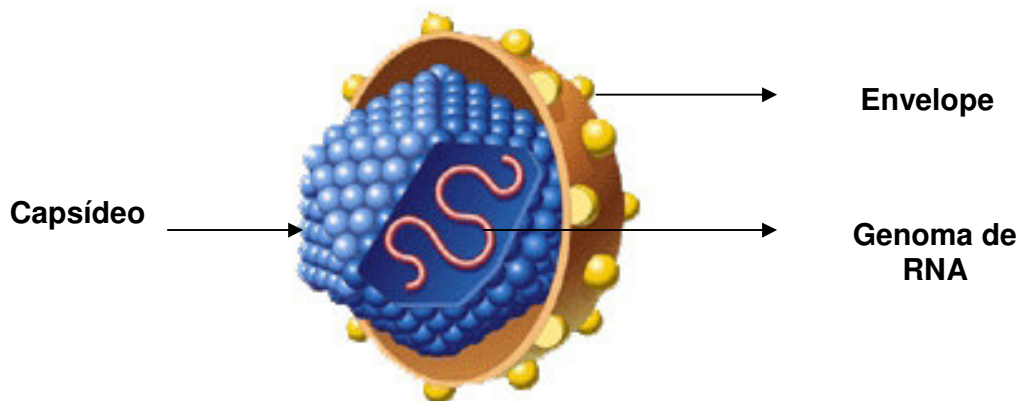


Figura 1: Representação esquemática do vírus da hepatite C (www.rit.edu)

O genoma viral apresenta uma única ORF (*open reading frame* – fase aberta de leitura), flanqueada por regiões não traduzidas (UTR, *untranslated region*) nas extremidades 5' e 3'. A região codificante dá origem a uma poliproteína precursora de aproximadamente 3000 aminoácidos, que sofre clivagem co-traducional e pós-traducional, por proteases virais e celulares, resultando nas proteínas estruturais, que incluem a proteína do capsídeo (*core*) e duas glicoproteínas do envelope (E1 e E2) e, as proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (Penin, *et al.*, 2004; Dubuisson, 2007). A Figura 2 indica, de maneira esquemática, a organização do genoma e das proteínas do HCV.

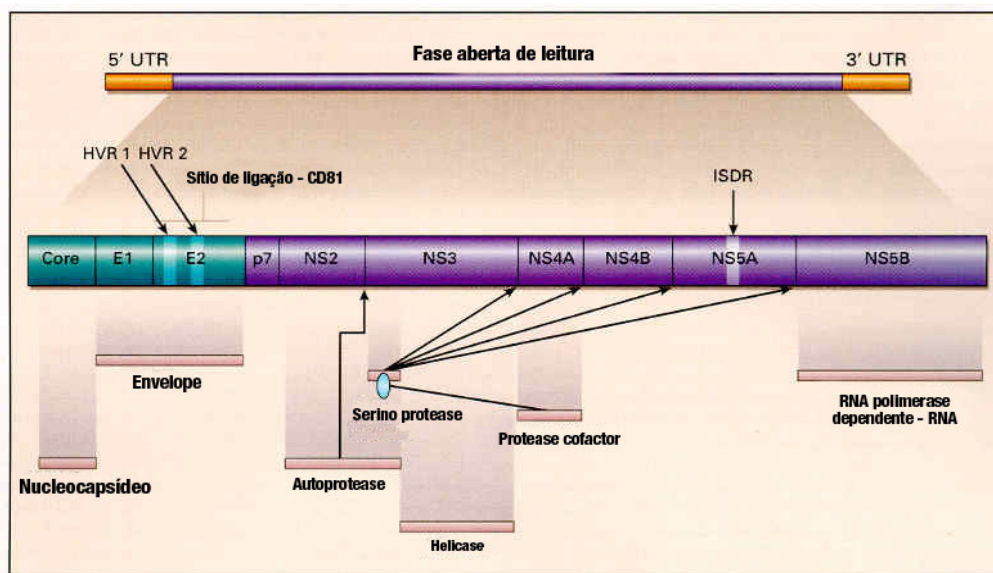


Figura 2: Representação esquemática da organização do genoma e das proteínas do vírus da hepatite C (<http://www.expertreviews.org>)

A região 5' UTR consiste de aproximadamente 340 nucleotídeos. É a região mais conservada do genoma viral e apresenta uma estrutura secundária complexa, com a formação de alças (*stem-loop*), constituindo uma série de quatro domínios, os quais juntamente com parte da região *core* (20 a 40 nt) formam o sítio de entrada ribossomal IRES (*internal ribosome entry site*), que desempenha papel importante na ligação do RNA viral à subunidade 40S do

ribossoma da célula hospedeira e na iniciação da síntese da poliproteína viral (Penin *et al.*, 2004).

A região 3' UTR apresenta estrutura tripartida, sendo sua parte inicial, constituída por aproximadamente 40 nucleotídeos, pouco conservada entre os diferentes isolados do HCV, seguida de uma seqüência de polipirimidina (poli U ou poli UC) de extensão variável e de uma seqüência altamente conservada de aproximadamente 100 nucleotídeos, denominada de cauda 3'X (Penin, *et al.*, 2004).

A primeira clivagem da poliproteína gera a proteína *core* (C), que forma o nucleocapsídeo, e ocorre por meio de peptidases da célula hospedeira. Essa proteína possui um domínio N-terminal hidrofílico com aminoácidos carregados positivamente e, um domínio C-terminal hidrofóbico, características essas encontradas em proteínas de capsídeo. Relatos indicam que a proteína *core* interage com uma variedade de proteínas celulares e, acredita-se que esteja envolvida na sinalização celular, apoptose, carcinogênese e no metabolismo dos lipídios (Penin, *et al.*, 2004; Dubuisson, 2007).

A síntese de uma proteína codificada, por uma fase de leitura alternativa, na região *core* foi descrita por alguns autores, sendo designada ARF (*alternative reading frame* – fase alternativa de leitura) ou proteína F (frame shift - fase alternada). Essa proteína possui cerca de 60 aminoácidos, podendo ser sintetizada durante a infecção pelo HCV e, é capaz de estimular respostas imuno específicas (Xu *et al.*, 2001; Brass *et al.*, 2006). Apesar do papel da proteína F ou ARF na replicação viral não estar definido, a mesma pode ter algumas das funções atribuídas à proteína *core*, como a indução da carcinogênese e da resposta imune do hospedeiro (Walewski *et al.*, 2001, Branch *et al.*, 2005; Dubuisson, 2007).

As proteínas E1 e E2 são glicoproteínas transmembrana tipo 1, que apresentam ectodomínios N-terminal com 160 e 334 aminoácidos, respectivamente, e um pequeno domínio transmembrana C-terminal com aproximadamente 30 aminoácidos. E1 e E2 apresentam de 5 a 11 sítios de glicosilação, sendo muitos deles conservados e, parecem ser importantes no dobramento da proteína e na entrada do vírus na célula (Lavie *et al.*, 2007). E2 também possui sítios que se ligam a receptor CD81, expresso em células como

hepatócitos e linfócitos, e a receptores LDL (*low-density lipoprotein*) (Penin, *et al.*, 2004; Dubuisson, 2007).

A primeira região hipervariável identificada em E2 foi denominada de HVR1 (*hypervariable region 1*). Essa região representa os primeiros 27 aminoácidos de E2 e, parece direcionar a seleção de anticorpos contra variantes que escapam do sistema imune. Apesar da grande variabilidade em HVR1, as propriedades físico-químicas dos resíduos e a estrutura conformacional da região são altamente conservadas entre os genótipos. Essa seqüência apresenta resíduos básicos, com cargas positivas em posições específicas, sugerindo ser importante no reconhecimento e na ligação do vírus na célula hospedeira (Penin, *et al.*, 2004; Dubuisson, 2007).

A segunda região hipervariável, HVR2, foi descrita em isolados do subtipo 1b do HCV, sendo constituída por sete aminoácidos nas posições 91 a 97 da glicoproteína E2, correspondendo às posições 461-480 da poliproteína e parece modular a ligação do vírus a receptores celulares (Kato *et al.*, 2001; Penin, *et al.*, 2004). Recentemente, foi descrita uma terceira região hipervariável, HVR3, abrangendo os aminoácidos das posições 431 a 466 da glicoproteína E2 (Troesch *et al.*, 2006).

Taylor e colaboradores demonstraram que a proteína E2 interfere na atividade antiviral do interferon. A proteína E2 liga-se a PKR inibindo, desse modo, a atividade quinase da proteína indutora de interferon. Essa interação é um dos mecanismos que permite ao HCV escapar da ação do interferon (Taylor *et al.*, 1999; Rehmann, 2000; Farci & Purcell, 2000; Pawlotsky, 2003).

A p7 é uma proteína pequena, com 63 aminoácidos e dois domínios transmembrana, e parece ter atividade de canal iônico. As propriedades e a estrutura de membrana sugerem que a proteína pertence à família das viroporinas, tendo um papel funcional na maturação e eliminação da partícula viral pela via secretória (Penin *et al.*, 2004; Dubuisson, 2007).

A proteína NS2 e os primeiros 180 resíduos de NS3 constituem a proteinase NS2/NS3, responsável pela clivagem entre NS2 e NS3. Evidências sugerem que essa atividade necessita da interação com as chaperonas celular Hsp90 (Dubuisson, 2007).

NS3 é uma proteína multifuncional, com um domínio serino-protease na porção N-terminal e um domínio RNA helicase/NTPase (442 aa) na porção C-

terminal. A função serino-protease é responsável pela clivagem das junções NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B, e a atividade proteolítica é estabilizada pelo co-fator NS4 (54 aa). A proteína NS4 ancora a protease as membranas celulares, através de um domínio transmembrana N-terminal e, estabiliza a protease contra a degradação proteolítica (Penin, *et al.*, 2004; Dubuisson, 2007).

NS4B é uma proteína altamente hidrofóbica que contém quatro domínios transmembranas e, induz alterações na membrana celular formando estruturas membranosas, as quais vão servir de sustentação para o complexo de replicação do RNA do HCV (Penin, *et al.*, 2004; Dubuisson, 2007).

NS5A é uma fosfoproteína associada à membrana com função ainda não conhecida. A proteína é fosforilada por quinases não identificadas, no entanto, sua interação com proteínas celulares sugere que essa proteína seja essencial no complexo de replicação. Alguns autores sugerem que NS5A esteja envolvida na resistência de células infectadas ao efeito antiviral do interferon. Enomoto *et al.* (1995) identificaram um domínio de NS5A, entre os resíduos de aminoácidos 2209 e 2248, o qual designaram de ISDR (*interferon sensitivity determining region* - região determinante de sensibilidade ao interferon). Essa região interage com PKR (proteína quinase celular), a qual intervém na resposta antiviral de interferon da célula hospedeira (Polyak *et al.*, 2001; Penin, *et al.*, 2004; Dubuisson, 2007). Entretanto, estudos realizados na América do Norte e Europa, relatam dados conflitantes em relação à sequência ISDR (Gretch, 2001; Polyak *et al.*, 2001).

NS5B é uma RNA polimerase dependente de RNA (*RdRP*), sendo altamente conservada e essencial para replicação do RNA HCV (Penin, *et al.*, 2004; Dubuisson, 2007).

1.1.2 Variabilidade do vírus da hepatite C

A variabilidade genética do HCV é uma das características mais relevantes desse agente. A análise filogenética permitiu a classificação do vírus em seis genótipos e vários subtipos, de acordo com as regiões codificadoras homólogas e seqüências completas do genoma (Simmonds *et al.*, 2005). Os genótipos

foram numerados em algarismos arábicos (1 a 6) e, os subtipos foram designados por letras minúsculas (a,b,c,d,..) na ordem de identificação (Simmonds *et al.*, 1994). O genótipo da primeira variante clonada por Choo *et al.* (1989) foi caracterizada como subtipo 1a e, outra seqüência com similaridade entre 77% e 78,9% foi designada subtipo 1b (Simmonds *et al.*, 1994). Os genótipos diferem entre si em 31% a 33% nas seqüências dos nucleotídeos, enquanto que os subtipos entre 20% a 25%, e diferentes isolados do mesmo subtipo podem diferir de 5% a 15% (Simmonds *et al.*, 2005). A Figura 3 ilustra a filogenia do HCV.

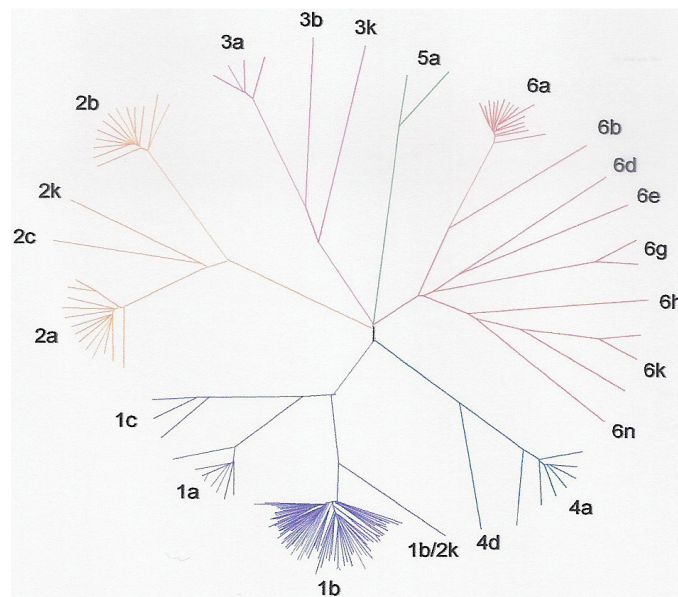


Figura 3: Filogenia do HCV. Análise filogenética dos diferentes genótipos do HCV
Fonte: Timm & Roggendorf, 2007

A análise da população do vírus obtida de um mesmo indivíduo tem mostrado que as seqüências de nucleotídeos nem sempre são homogêneas. Observa-se uma variação genética (1-5%), com o aparecimento e a seleção de subpopulações virais, caracterizando, assim, as *quasispecies* (Martell *et al.*, 1992; Hoofnagle, 2002).

A heterogeneidade genética do HCV não é uniforme em todo o genoma. A região 5' UTR é a mais conservada, seguida das regiões do *core*, NS3 e NS5B.

A região 5' UTR apresenta mais de 90% de identidade entre as seqüências de isolados descritos, seguida da região *core* com 81 a 88%. Por outro lado, as regiões com maior variabilidade são as que codificam as glicoproteínas do envelope E1 e E2 (Le Guillemette-Guillou *et al.*, 2007). Devido essa região mostrar um alto grau de variabilidade, ela tem sido muito usada para investigação da complexidade e diversidade de *quasispecies* do HCV (Farci & Purcell, 2000).

O professor Manfred Eigen, em 1988 foi o primeiro a introduzir o conceito de *quasispecies*. Ele definiu como um grupo de moléculas autoreplicativas, diferentes, mas relacionadas entre si, evoluindo como uma simples unidade quando enfrentam mudanças no ambiente. As variantes presentes nas *quasispecies* não refletem os mutantes gerados durante o erro de replicação, mas o resultado de uma competição seletiva entre tais mutantes baseada na capacidade de replicar num dado ambiente. *Quasispecies* virais incluem uma seqüência *máster*, que é considerada dominante, e um grande número de seqüências menores, representando a população total. A permanência por longo prazo dessa população viral ocorre quando o vírus tem um “*fitness*” replicativo num ambiente definido e constante do hospedeiro. Durante a infecção, a distribuição de *quasispecies* representa a população que melhor se adapta e que estabelece um equilíbrio com o hospedeiro. É provável que mutações selecionadas pela pressão imune acabem interferindo no “*fitness*” viral (Farci & Purcell, 2000; Fabrizi *et al.*, 2002).

1.1.3 Ciclo de replicação do vírus da hepatite C

O entendimento do ciclo de multiplicação do HCV tem sido dificultado pela falta de um eficiente sistema de cultura de células. No entanto, alguns detalhes do ciclo estão surgindo com a utilização de sistemas *in vitro*, como o de replicon subgenômicos do HCV, pseudopartículas (HCVpp) e, mais recentemente, um sistema eficiente de partículas de vírus que são infecciosas em culturas de células (HCVcc) (Lohmann *et al.*, 1999; Bartosch *et al.*, 2003; Lindenbach *et al.*, 2005). Esses sistemas foram de grande importância, tanto para delinear as fases

do ciclo de replicação do HCV, como permitiram a identificação de antivirais específicos para o HCV (Lohmann *et al.*, 1999; Lindenbach *et al.*, 2005).

O primeiro sistema de replicação do HCV *in vitro* com bom desempenho foi o desenvolvimento do *replicon*, que significa a capacidade de replicação autônoma de regiões subgenômicas do genoma. Embora esse sistema de *replicons* de RNA HCV somente se replicam com eficiência em células Huh-7, esse modelo foi utilizado para o estudo da replicação e expressão de proteínas virais (Lohmann *et al.*, 1999; Bartenschlager *et al.*, 2003).

Com o propósito de observar etapas iniciais da infecção, e fornecer um melhor entendimento da adsorção e penetração do vírus na célula, o desenvolvimento de pseudopartículas (HCVpp) forneceu a melhor compreensão dessas etapas (Bartosch *et al.*, 2003; Bartosch & Cosset, 2006). Nesse sistema, retrovírus são usados para produzir pseudopartículas expressando glicoproteínas do envelope do HCV e, essas HCVpp são produzidas em células 293T (Lavie *et al.*, 2007; Dubuisson *et al.*, 2008).

Recentemente, foi desenvolvido um sistema de cultura de células que permite uma eficiente replicação do HCV (HCVcc). Esse sistema é baseado na transfecção em linhagem de células de hepatoma humano (Huh-7) com RNA HCV derivado da clonagem do genoma viral de um paciente japonês com hepatite fulminante. Esse sistema permitiu o estudo do ciclo viral completo e, também confirma os resultados gerados pelo sistema HCVpp (Lavie *et al.*, 2007; Dubuisson *et al.*, 2008).

Dessa forma, a proteína E2 mostrou ter grande afinidade pelo receptor CD81, encontrado na superfície de várias células, inclusive nos hepatócitos. O receptor CD81, além dos receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL), parecem estar envolvidos na entrada do vírus na célula (Bartenschlager & Lohmann, 2000; Brass *et al.*, 2006; Lavie *et al.*, 2007; Dubuisson *et al.*, 2008). A expressão de CD81 não é suficiente para a entrada do HCV nos hepatócitos, sugerindo que outras proteínas ainda não identificadas sejam necessárias (Bartosch *et al.*, 2003).

Após a entrada do vírus via endocitose mediada por receptor, o RNA genômico é liberado no citoplasma (Dubuisson *et al.*, 2008). A tradução das proteínas acredita-se ser mediada pelo IRES, que se liga a subunidade 40S do ribossoma e, o vírus forma um complexo de replicação associado à formação de

vesículas de membranas (*membranous web*). Esse complexo é formado por proteínas virais, replicação do RNA, alteração das membranas celulares e fatores celulares. Fitas de RNA negativas geradas servirão de molde para as fitas RNA positivas, que iniciarão novo ciclo de replicação, ou poderão ser traduzidas nas proteínas para a montagem de novas partículas virais, as quais serão liberadas pela via secretória. No entanto, a montagem e liberação das partículas virais ainda são pouco entendidas (Bartenschlager & Lohmann, 2000; Thimme *et al.*, 2006).

A replicação do vírus resulta em aproximadamente 10^{10} a 10^{12} vírions por dia na fase crônica da infecção. Entretanto, a média de mutações é estimada em $1,44$ a $1,92 \times 10^{-3}$ substituições por base por sítio por ano e, isso se deve a ausência de mecanismos de revisão dos erros da RNA polimerase RNA dependente, gerando uma alta diversidade genética (Bartenschlager & Lohmann, 2000).

1.2 Epidemiologia da Infecção pelo Vírus da Hepatite C

1.2.1 Transmissão

O principal fator associado à transmissão do HCV é a exposição ao sangue, por meio de transfusão de sangue ou derivados, órgãos transplantados de doadores infectados, uso de drogas injetáveis e de materiais perfuro-cortantes não esterilizados (Lauer & Walker, 2001). A transmissão por transfusão de sangue ou derivados contaminados foi o principal meio de disseminação da infecção pelo HCV; no entanto, a partir de 1990, com a implantação de ensaios sorológicos sensíveis para a detecção de anticorpos anti-HCV, em bancos de sangue, houve um decréscimo significativo no risco da infecção associada à transfusão (Lauer & Walker, 2001). Assim, com a introdução desses ensaios e a detecção do RNA viral por PCR (*polymerase chain reaction*), o risco estimado de transmissão do HCV é de um caso por 100.000 transfusões (Rodés & Tapias, 2000).

Porém, novos casos de hepatite C continuam surgindo e, nos países desenvolvidos, o uso de drogas injetáveis tem sido o principal fator de risco para

infecção pelo HCV nas últimas décadas (Shepard *et al.*, 2005; Alter, 2007). De 40% a 80% dos usuários de drogas injetáveis apresentam a infecção pelo HCV (Rodés & Tapias, 2000; Sy & Jamal, 2006).

A transmissão do HCV por exposição ocupacional, perinatal e sexual é relativamente baixa. A transmissão ocupacional do HCV em profissionais da saúde apresenta-se em torno de 0,3%. A transmissão perinatal é estimada entre 4% e 7%, e aumenta até cinco vezes nos casos de mães co-infectadas com HIV. A transmissão sexual entre parceiros infectados, ou entre múltiplos parceiros, tem sido um fator de risco para a transmissão do HCV, enquanto que em indivíduos com relacionamento monogâmico sua ocorrência é baixa (Shepard *et al.*, 2005; Alter, 2007).

Devido a uma variedade de atividades com exposição percutânea, outros meios de transmissão têm sido relatados, incluindo tatuagens, *body-piercing*, acupuntura, uso de droga intranasal, práticas religiosas ou culturais, como escarificação e circuncisão, barbeamento comercial e manicure (Shepard *et al.*, 2005; Alter 2007).

A transmissão nosocomial tornou-se a principal causa da infecção pelo HCV em unidades de hemodiálise (Jadoul, 2000; Rahnavardi *et al.*, 2008). Recentemente, análise filogenética de isolados de pacientes dentro de uma mesma unidade mostrou que essa transmissão ocorre pelo contato paciente-paciente. A disseminação do HCV também pode ocorrer durante os procedimentos de diálise, por contato com superfícies ambientais, medicamentos, luvas ou objetos contaminados de procedimentos cirúrgicos/invasivos, devido à esterilização inadequada dos instrumentos (Rodés & Tapias, 2000; Carneiro *et al.*, 2007; Sulowicz *et al.*, 2007; Rahnavardi *et al.*, 2008).

1.2.2 Prevalência

A Organização Mundial de Saúde (WHO *World Health Organization*) estima que a prevalência da infecção pelo HCV no mundo seja de aproximadamente 2% a 3% (Baldo *et al.*, 2008), variando entre as diferentes regiões geográficas (Figura 4). Países com alta prevalência estão localizados na África e Ásia,

enquanto os que apresentam baixa prevalência incluem nações da América do Norte, da parte norte e ocidental da Europa e Austrália (Shepard *et al.*, 2005; Baldo *et al.*, 2008). No norte da Europa, a prevalência varia de 0,1% a 1,0%, enquanto que no norte da África é maior que 2,9%. O país com menor prevalência é a Suécia, que apresenta índice de 0,003%; já a maior prevalência da infecção pelo HCV ocorre no Egito, com 18% a 22% (Shepard *et al.*, 2005; Sulowicz *et al.*, 2007; Alter, 2007; Rustgi, 2007; Baldo *et al.*, 2008; Maheshwari *et al.*, 2008).

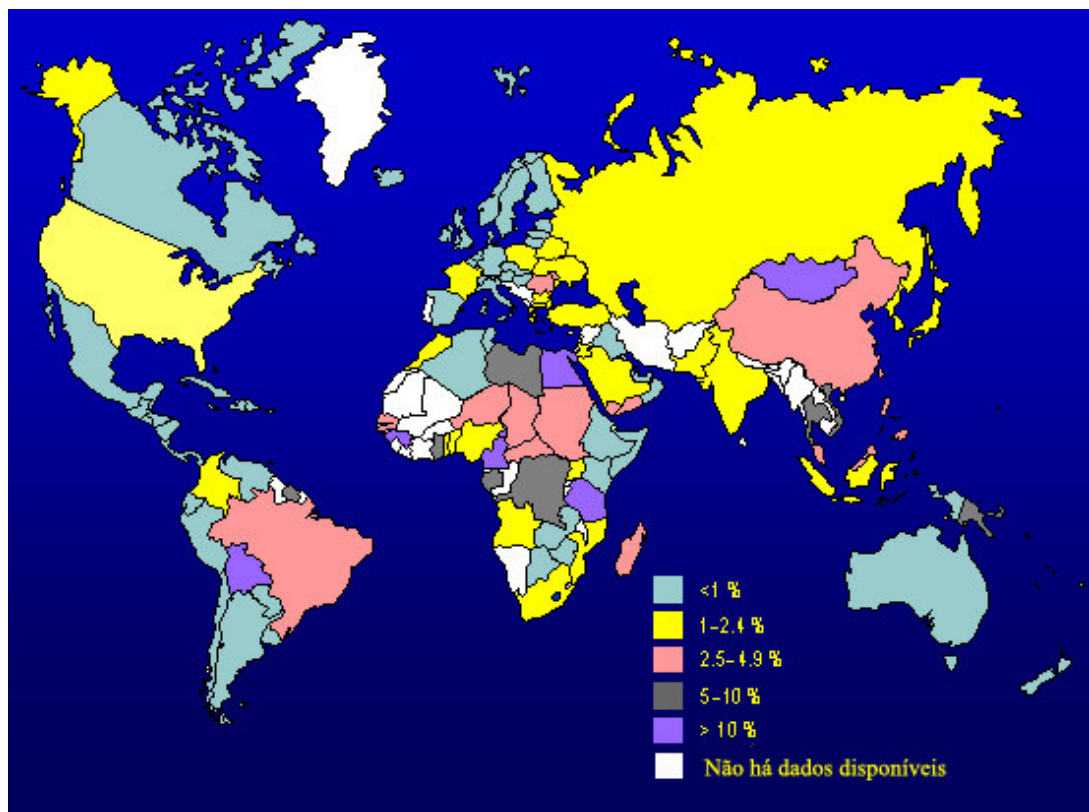


Figura 4: Estimativa da prevalência da infecção pelo vírus da hepatite C no mundo (www.marktest.com/wap/a/n/id%7E225.aspx) (com modificações).

Estima-se em 10 milhões o número de pessoas infectadas pelo HCV na América Latina (Dehesa-Violante & Nuñez-Nateras, 2007; Alter, 2007), onde a soroprevalência em doadores de sangue é de 0,69% no Paraguai, de 0,66% no México, 0,65% na Argentina, 0,57% no Peru, 0,56% na Bolívia e 0,9% no Chile (Dehesa-Violante & Nuñez-Nateras, 2007).

No Brasil, ainda existem poucos estudos de prevalência da infecção na população em geral (Foccacia *et al.*, 1998). Um estudo de base populacional realizado na cidade de São Paulo por Foccacia *et al.* (1998) relatou uma prevalência de 1,43%. Resultado semelhante (1,5%) foi obtido em um estudo de soroprevalência em Salvador (Zarife *et al.*, 2006). O Ministério da Saúde está conduzindo um inquérito nacional de base populacional nas capitais brasileiras, cujos resultados preliminares mostram uma prevalência de anti-HCV variando de 0,9% a 1,9% na faixa etária de 10 a 69 anos de idade (Ministério da Saúde, 2008).

Num estudo realizado no Distrito Federal em doadores de sangue, a soroprevalência foi de 0,2% (Amorim, 2004). Na população de indivíduos portadores de insuficiência renal, a prevalência de anti-HCV foi de 13,1% (Trevizoli, 2004).

1.2.3 Distribuição geográfica dos genótipos

A distribuição geográfica dos genótipos do HCV varia significativamente. Os genótipos 1, 2 e 3 tem distribuição universal, enquanto os demais são restritos a determinadas áreas geográficas. O genótipo 4 circula no norte da África e Oriente Médio, e os genótipos 5 e 6 na África do Sul e sudeste da Ásia, respectivamente (Zein, 2000).

O subtipo 1a é predominante na América do Norte e no norte da Europa, enquanto que o subtipo 1b no Japão, sul e leste Europeu (Farci & Purcell, 2000; Rodés & Tapias, 2000).

A genotipagem do HCV, além de importantes implicações epidemiológicas, também tem permitido observar que os subtipos 1a e 3a estão emergindo, enquanto os subtipos 2a, 2c e 1b apresentam declínio. Esse fato provavelmente é explicado pela alta prevalência do subtipo 3a na população jovem, principalmente em usuários de drogas, e com a recente circulação desse genótipo na população em geral (Zein, 2000; Farci & Purcell, 2000).

Campiotto *et al.* (2005) determinaram a freqüência dos genótipos do HCV em pacientes cronicamente infectados provenientes das cinco regiões geográficas do Brasil, sendo o genótipo 1 o mais prevalente em todas as regiões (64,9%), seguido dos genótipos 2 (4,6%) e 3 (30,2%); já os genótipos 4 e 5 em

0,2% e 0,1%, respectivamente. A Figura 5 apresenta a distribuição dos genótipos do HCV nas diferentes regiões do Brasil.

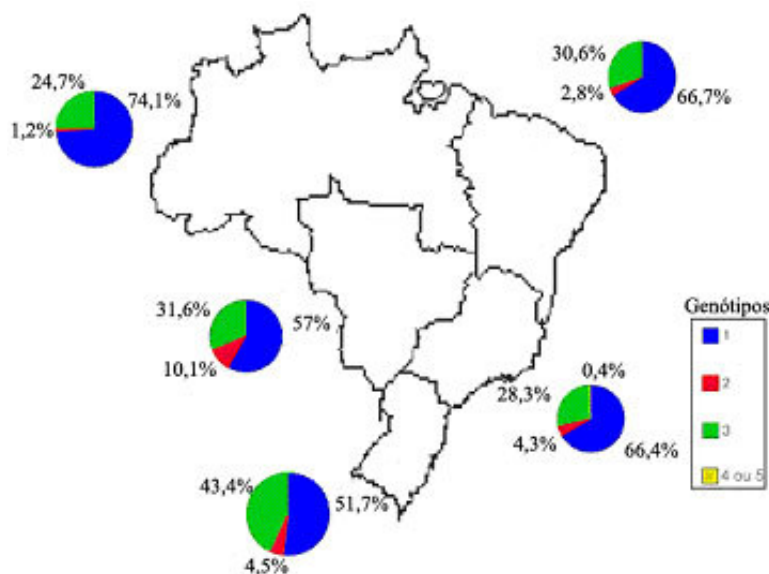


Figura 5: Distribuição dos genótipos do HCV nas diferentes regiões do Brasil

Fonte: Campiotto *et al.*, 2005 (com modificações)

A distribuição dos genótipos em doadores de sangue das Regiões Sudeste (Rio de Janeiro), Nordeste (Rio Grande do Norte) e Centro-Oeste (Goiás) foi analisada por Martins *et al.* (1998). Os resultados mostraram uma prevalência de 35,3% para os subtipos 1a e 3a no Nordeste, de 41,9% e 35,5% no Sudeste para os genótipos 1b e 1a, respectivamente, e no Centro-Oeste, o subtipo 1a apresentou maior prevalência (54,6%), seguido pelo subtipo 3a (31,8%). Em contraposição à Campiotto e colaboradores, estudos realizados no sul do País, mostram que o genótipo 3 foi o mais prevalente, seguido do genótipo 1 e 2 (Krug *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 1999; Silva, *et al.*, 2007).

Os genótipos do HCV em doadores de sangue no Distrito Federal foram caracterizados, sendo encontrados uma prevalência de 60,9% para o genótipo 1 e de 39,1% para o genótipo 3 (Amorim, 2004). Num estudo em pacientes hemofílicos, também no Distrito Federal, o genótipo 1 foi encontrado em 76,5% dos portadores, e 5,9% apresentaram o genótipo 3 (Carvalho, 1999).

1.3 Diagnóstico da Infecção pelo Vírus da Hepatite C

A identificação do HCV e a análise das seqüências de nucleotídeos de seu genoma possibilitaram o desenvolvimento de imunoenaios e testes moleculares para o diagnóstico da hepatite C. No diagnóstico e o monitoramento dessa infecção, são utilizados os testes sorológicos, os quais detectam anticorpos específicos anti-HCV, e os ensaios moleculares, que detectam, quantificam e caracterizam o RNA do HCV (Erensoy, 2001).

Na infecção aguda (Figura 6), os anticorpos anti-HCV podem ser detectados entre sete e oito semanas após a exposição ao vírus, enquanto que o RNA HCV entre a primeira e a segunda semana. Pode ocorrer também elevação nos níveis de ALT (alanina aminotransferase), mesmo antes do aparecimento dos sintomas (Lauer & Walker, 2001; Hoofnagle, 2002; Chen & Morgan, 2006).

Em 15 a 25% dos casos com infecção aguda pelo HCV, a mesma é resolvida espontaneamente, apresentando o RNA HCV indetectável e os níveis das enzimas hepáticas normais (Chen & Morgan, 2006).

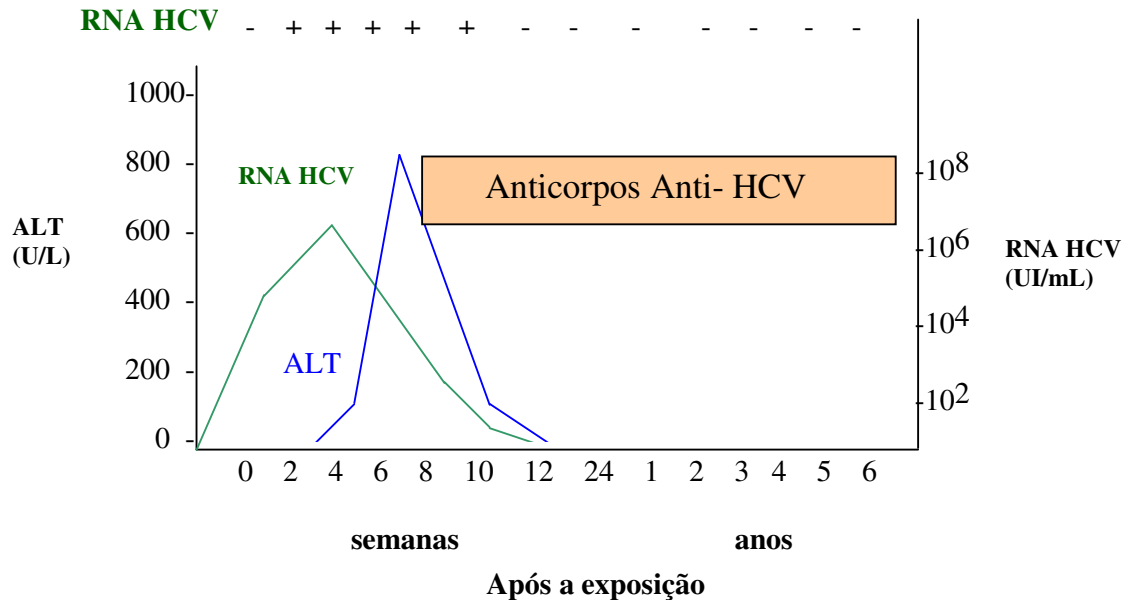


Figura 6: Curso da infecção aguda pelo HCV. A linha verde representa o resultado do teste quantitativo para o RNA HCV em UI/mL (unidade internacional por ml). O teste qualitativo está representado pelos sinais positivo (+) e negativo (-). A linha azul reproduz os níveis de alanina aminotransferase (ALT). Fonte: Hoofnagle, 2002)

Uma das características mais importantes da infecção pelo HCV é a evolução para a cronicidade. Cerca de 75% a 85% dos portadores desenvolvem infecção crônica, estabelecida pela persistência do RNA HCV por, no mínimo seis meses após o início da infecção (Chen & Morgan, 2006). Esse processo é caracterizado por um longo período assintomático, onde o RNA HCV e os níveis de ALTs flutuam consideravelmente, com períodos em que não se detecta o RNA, e as enzimas hepáticas apresentam níveis normais (Figura 7). Aproximadamente 30% dos pacientes com infecção crônica apresentam níveis normais da ALT (Puoti *et al.*, 2007).

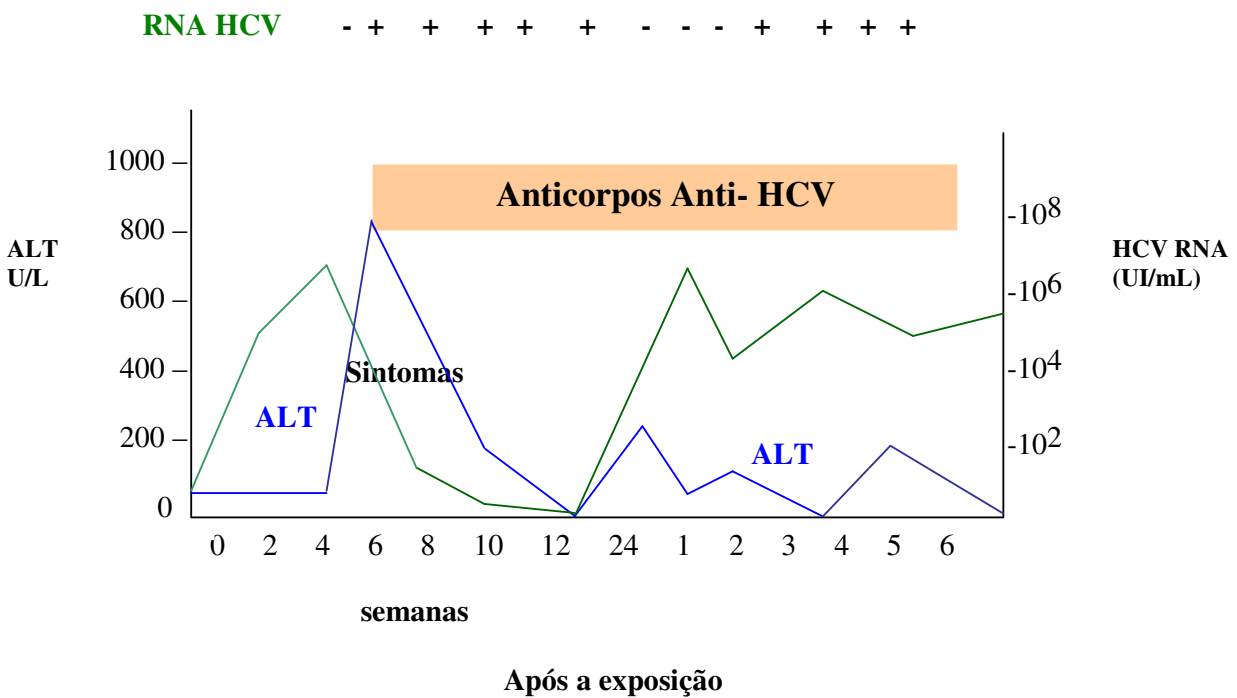


Figura 7: Curso da infecção aguda, evoluindo para infecção crônica pelo HCV. A linha verde representa o resultado do teste quantitativo para o RNA do HCV em UI/mL (unidade internacional por ml). O teste qualitativo está representado pelos sinais positivo (+), e negativo (-). A linha azul reproduz os níveis de alanina aminotransferase (ALT). Fonte: Hoofnagle, 2002

Três gerações de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anti-HCV foram desenvolvidos. O ELISA de primeira geração utilizava como antígeno o peptídeo sintético c100, correspondente à região NS4. Esse teste foi liberado comercialmente em 1990, representando um grande avanço na redução do risco de infecção pelo HCV associado à transfusão (Zein, 2000; Erensoy, 2001).

Devido a baixa especificidade e sensibilidade do ELISA-1, foi desenvolvido o teste ELISA de segunda geração. Esse teste foi liberado em 1992, e incorporou dois antígenos adicionais: o antígeno c22, derivado da região *core*, e o antígeno c33 da região NS3 do genoma viral (Erensoy, 2001).

O teste de terceira geração incluiu antígenos recombinantes, além de dois peptídeos sintéticos, que permitem detectar anticorpos para as regiões *core*, NS3, NS4 e NS5 (Zein, 2000; Erensoy, 2001). A especificidade e sensibilidade desse ensaio são maiores que 99% em indivíduos imunocompetentes infectados pelo HCV (Chevaliez & Pawlotsky, 2007). No entanto, podem produzir resultados falso-negativos em pacientes em hemodiálise ou imunodeprimidos, nos quais os níveis de anticorpos anti-HCV podem ser baixos ou não detectáveis (Chen & Morgan, 2006).

Com os ensaios utilizados atualmente, a detecção dos anticorpos após o início da infecção, período de soroconversão, é de sete a oito semanas, comparado a 10 semanas no ELISA 2 e de 16 semanas no ELISA 1 (Erensoy, 2001).

Um teste suplementar, o *immunoblot (recombinant immunoblot assay)*, foi desenvolvido para confirmar os resultados do ELISA. Esse teste é recomendado para grupos de baixa prevalência, como os doadores de sangue (Erensoy, 2001; Lauer & Walker, 2001; Pawlotsky, 2002). Atualmente, é pouco utilizado devido à elevada especificidade e sensibilidade do ELISA de terceira geração, bem como pela disponibilidade dos testes para detecção do RNA viral (Lauer & Walker, 2001; Richter, 2002; Chevaliez & Pawlotsky, 2007).

A genotipagem sorológica ou sorotipagem é um ensaio simples que permite determinar os genótipos do HCV. Esse teste usa anticorpos genótipo-específicos (1 a 6), mas não diferencia os subtipos (Pawlotsky, 2002; Chevaliez & Pawlotsky, 2007).

Ainda pela análise sorológica, a detecção do antígeno *core* por ELISA pode auxiliar na detecção precoce do HCV, reduzindo assim, os problemas com a

janela imunológica. Os títulos desse antígeno correlacionam-se diretamente com os níveis do RNA HCV, podendo, portanto, ser usado como um marcador de replicação viral. Entretanto, sua eficácia é limitada em casos de carga viral baixa (Pawlotsky, 2002; Ferreira-Gonzalez & Mitchell, 2004).

Nos últimos anos, os testes para detectar, quantificar e caracterizar o RNA viral tem sido valiosos no monitoramento do tratamento da infecção pelo HCV. A detecção do RNA HCV tornou-se essencial para confirmar o diagnóstico da infecção pelo vírus, e selecionar os pacientes que farão uso da terapia antiviral. O RNA HCV pode ser detectado no sangue num período de uma a duas semanas depois da exposição ao vírus. Os níveis de RNA elevam-se rapidamente durante as primeiras semanas, atingindo concentrações de 10^5 a 10^7 UI/mL (unidade internacional por mL), antes mesmo de ocorrer elevação das aminotransferases e o início dos sintomas (Lauer & Walker, 2001; Chen & Morgan, 2006).

Os ensaios qualitativos são baseados em amplificações por RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) ou TMA (*transcription-mediated amplification*) (Chevaliez & Pawlotsky, 2006; Scott & Gretch, 2007). Esses ensaios baseiam-se na amplificação do ácido nucléico utilizando ciclos de reações enzimáticas e gerando um número elevado de cópias detectáveis. Na PCR, são amplificadas cópias de DNA dupla fita, enquanto que na técnica TMA, são cópias de RNA fita simples. O limite de detecção da RT-PCR é de 50 UI/mL, enquanto que o ensaio de TMA é de 5 UI/mL (Chevaliez & Pawlotsky, 2006; Scott & Gretch, 2007).

Ensaio quantitativos foram desenvolvidos com a finalidade de medir os níveis de viremia no sangue, como a RT-PCR (detecção: 600-500.000 UI/mL, *Monitor v2.0, Roche Diagnostic*), branched-chain DNA (detecção: 615-7,7 milhões UI/mL, *Quantiplex bDNA v.3,0 assay, Bayer Diagnostic*) e a PCR em tempo real, que apresenta uma ampla faixa de detecção (10-100 milhões UI/mL, *TaqMan Real-Time PCR Roche Molecular Systems*). Essa característica torna o último ensaio útil para monitorar a carga viral em pacientes com hepatite C tratados ou não (Chevaliez & Pawlotsky, 2006; Scott & Gretch, 2007).

A genotipagem do HCV tem importantes implicações epidemiológicas, além de ser útil no prognóstico e no tratamento da infecção (Zein, 2000; Scott & Gretch, 2007). Diferentes métodos são utilizados para genotipagem do HCV, os

quais são baseados em seqüências amplificadas por PCR, geralmente envolvendo as regiões 5' UTR, NS5B, E1 e *core* (Zein, 2000; Erensoy, 2001). A região 5' UTR é muito conservada, apresentando um polimorfismo na posição -99 com uma adenina no subtipo 1a e uma guanina no subtipo 1b, o que dificulta a identificação desses subtipos com precisão. Assim, o padrão ouro de genotipagem é o sequenciamento direto das regiões NS5B ou E1, seguido de análise filogenética (Pawlotsky, 2002; Simmonds *et al.*, 2005; Chevaliez & Pawlotsky, 2006).

A hibridização reversa (Inno-LiPA) com sondas de oligonucleotídeos genótipo-específicas é um dos métodos mais empregados para genotipagem. Esse ensaio se baseia nas variações encontradas na região 5' UTR dos diferentes genótipos do HCV, sendo um teste rápido e fácil que determina os seis genótipos e os principais subtipos (Chevaliez & Pawlotsky, 2006; Scott & Gretch, 2007). Outro método para genotipagem é a PCR com *primers* tipo-específicos para a região *core*. A análise por RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) também é empregada para a genotipagem do HCV. Esse método baseia-se na digestão de produtos de PCR por enzimas de restrição, que reconhecem sítios de clivagem específicos para cada genótipo, resultando em fragmentos que possuem diferentes tamanhos (Pawlotsky, 2002).

A ALT pode apresentar níveis elevados, indicando alteração nos hepatócitos. A normalização da ALT não significa a recuperação do indivíduo infectado, nem eliminação do vírus, pois existem pacientes virêmicos com níveis normais dessa enzima. Portanto esse marcador não pode ser usado como referência para o diagnóstico ou monitoramento da infecção (Hoofnagle, 2002).

Na infecção pelo HCV, a biópsia hepática é um procedimento de grande valor por confirmar o diagnóstico de hepatite crônica, avaliar o grau e o estadiamento da doença, além de excluir ou detectar a presença de outras patologias. A biópsia é recomendada nos casos com marcadores virais positivos para o HCV e aumento de ALT, enquanto que nos casos de níveis normais dessas enzimas aconselha-se o monitoramento constante com determinações de ALT a cada três meses (Dienstag & Mchutchison, 2006; Asselah *et al.*, 2007).

C 1.4 Patogenia e Aspectos Clínicos da Infecção pelo Vírus da Hepatite

A infecção pelo HCV é a principal causa da hepatite crônica, cirrose e hepatocarcinoma. Embora possua as formas aguda e crônica, a principal morbidade associada à infecção é a evolução para cronicidade, sendo sua maior seqüela, num período de 10 a 30 anos, a progressão para fibrose no fígado, e estima-se que 10% a 20% dos portadores desenvolvem cirrose. Num estágio final, 1 a 4% dos pacientes poderão desenvolver carcinoma hepatocelular (HCC) (Figura 8) (Lauer & Walker, 2001; Shepard *et al.*, 2005; Chen & Morgan, 2006).

A infecção aguda é dificilmente diagnosticada, pois somente 10% a 20% dos indivíduos infectados apresentam manifestações clínicas, as quais se iniciam em média na sétima semana e se prolongam até 12 semanas após a exposição ao vírus. Alguns sintomas podem ser observados, como fadiga, mialgia, febre, náusea e icterícia (Lauer & Walker, 2001). Pacientes sintomáticos na fase aguda possuem uma chance menor de desenvolver infecção crônica em relação aos assintomáticos, o que tem sido associada a uma forte imunidade celular contra a infecção viral (Hoofnagle, 2002; Maheshwari *et al.*, 2008).

A carga viral e a diversidade de *quasiespécies* são fatores importantes na progressão da doença. Esses fatores em associação a alguns do hospedeiro, tais como: ingestão de álcool, co-infecção com vírus da imunodeficiência humana (HIV) e vírus da hepatite B (HBV), sexo masculino, idade avançada e o tempo da infecção, contribuem para a gravidade da patologia (Lauer & Walker, 2001; Hoofnagle, 2002).

Estudos comparando a diversidade genética com o curso da infecção têm apresentado resultados contraditórios. Embora alguns trabalhos sugiram associação dos genótipos com a progressão e a persistência da infecção, essa nem sempre é confirmada em outros estudos. Apesar dessa divergência, a evolução de *quasispecies* do HCV parece ter implicação importante na persistência da infecção (Farci *et al.*, 1997; Rehmann, 2000; Mondelli *et al.*, 2003; Rosen, 2003; Bowen & Walker, 2005; Pawlotsky, 2006).

A idade do indivíduo, quando da exposição ao vírus, tem sido considerada um fator importante na evolução da hepatite crônica. Estudos têm demonstrado que a chance de pacientes com menos de 20 anos desenvolverem hepatite

crônica é em torno de 30%, aumentando para 76% no grupo com 45 a 50 anos (Hoofnagle, 2002; Albertis & Benvegnù, 2003; Chen & Morgan, 2006).

Tanto o sexo masculino, como a etnia parece afetar a progressão da doença. Nos EUA, a taxa de cronicidade em indivíduos negros é maior quando comparada com a dos caucasianos e hispânicos brancos. Relatos também demonstram diferenças na resposta à terapia com antivirais. Esses dados sugerem que fatores genéticos são determinantes na progressão da infecção pelo vírus da hepatite C (Hoofnagle, 2002; Albertis & Benvegnù, 2003; Chen & Morgan, 2006).

Os indivíduos co-infectados com HIV ou HBV também apresentam progressão acelerada para hepatite crônica. Aproximadamente 25% dos pacientes infectados pelo HIV são também portadores do HCV (Albertis & Benvegnù, 2003). Após a introdução da terapia anti-retroviral, os indivíduos co-infectados têm apresentando uma rápida progressão da doença hepática em função da hepatotoxicidade, dos fármacos empregados e, conseqüentemente, uma menor sobrevida. Assim, o HCV pode aumentar a morbidade e mortalidade relacionada ao HIV-1 (Shepard *et al.*, 2005).

Em 1990, Pascual *et al.* observaram associação entre a infecção pelo HCV e várias manifestações extra-hepáticas, incluindo doença renal, desordens linfoproliferativas, neuropatias, síndrome Sjogren, dentre outras (Mayo, 2002; Ali & Zein, 2005). Em torno de 40% dos pacientes infectados com HCV desenvolvem pelo menos uma manifestação extra-hepática durante o curso da infecção (Ali, & Zein, 2005). Geralmente, essas desordens estão relacionadas com fenômenos envolvendo anticorpos e complexos imunes. Dentre essas, a crioglobulinemia mista é considerada uma das mais relevantes, acometendo entre 36 e 54% dos pacientes com hepatite C crônica (Ercilla & Viñas, 2000; Chen & Morgan, 2006). A causa da crioglobulinemia não é bem entendida, mas parece ser uma excessiva proliferação de linfócitos B induzidos pelo estímulo antigênico durante a infecção pelo HCV (Meyers *et al.*, 2003). As crioglobulinas têm afinidade pelos glomérulos resultando em glomerulonefrite, uma das doenças renais mais comumente encontradas em pacientes com hepatite C. Estudos prospectivos e retrospectivos têm relatado a prevalência de anticorpos anti-HCV nos pacientes com crioglobulinemia mista variando de 30% a 96% e,

do RNA HCV de 63% a 93% (Meyers *et al.*, 2003; Sène *et al.*, 2004). A Figura 8 esquematiza a história natural da infecção do HCV.

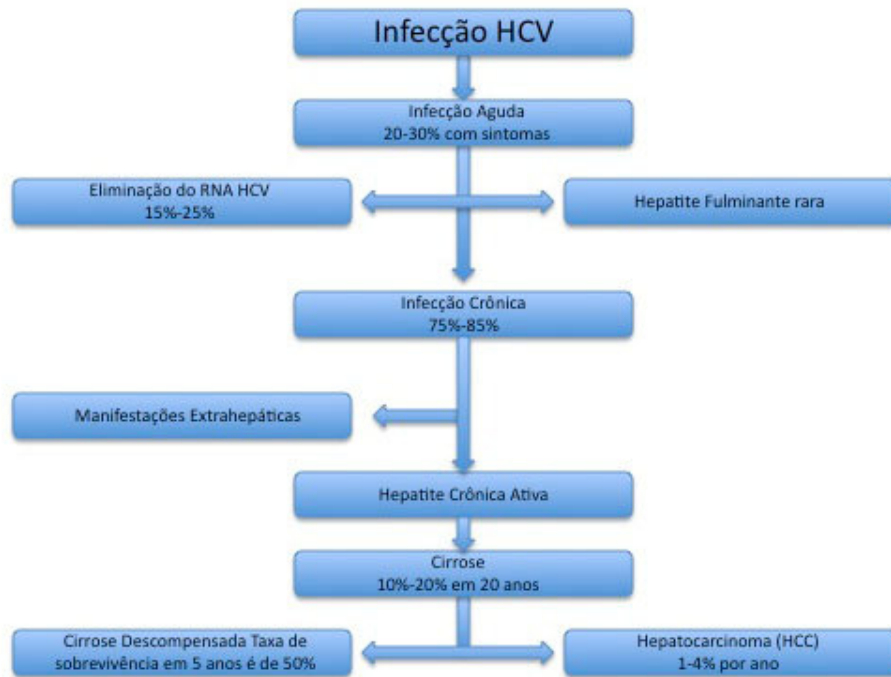


Figura 8: Esquema da história natural da infecção pelo vírus da hepatite C

Fonte: Chen & Morgan, 2006

1.5. Resposta Imune e Persistência do Vírus da Hepatite C

A resposta imune ocorre após a exposição ao vírus, ativando mecanismos que podem inibir a replicação viral. A partir da sétima ou oitava semana da infecção, os pacientes apresentam anticorpos que continuam na fase crônica. Assim, a presença desses anticorpos neutralizantes não impede a evolução para a cronicidade, nem a eliminação do vírus. Esses anticorpos também não são capazes de proteger o indivíduo contra reinfeção (Kaplan *et al.*, 2003; Gremion & Cerny, 2005; Ishii & Koziel, 2008).

Os primeiros epitopos para anticorpos neutralizantes foram localizados na HVR1, cuja variabilidade parece ser uma estratégia do vírus para escapar da resposta imune e estabelecer infecção persistente no indivíduo (Gremion & Cerny, 2005; Ishii & Koziel, 2008).

Zeisel e colaboradores (2007) citaram epitopos que foram identificados na HVR1, alvos de anticorpos neutralizantes. Dentre os encontrados, estão os aminoácidos 384-410; dois epitopos próximos à extremidade N-terminal de HVR1: aminoácidos 408-422 e 412-419 e, os aminoácidos 474-494 e 522-551 na região que se liga a CD81 (Zeisel *et al.*, 2007).

Nos pacientes com imunossupressão, a população viral tem se apresentado mais homogênea, sugerindo que a diversidade genética pode ser direcionada pelo sistema imune. Assim, uma menor diversidade em HVR1 foi observada nesses pacientes em relação aos imunocompetentes. Esse resultado foi observado nos pacientes agamaglobulinêmicos, em pacientes transplantados durante a fase de imunossupressão e nos indivíduos co-infectados com HIV com declínio nas células T CD4+ (Farci & Purcell, 2000).

Ao contrário dos anticorpos neutralizantes, existem evidências do papel determinante das células T CD4+ em reduzir a replicação viral na fase aguda da infecção e na eliminação do vírus. Os indivíduos RNA negativos e com as enzimas hepáticas normais apresentam uma robusta resposta das células CD4+ comparada à observada nos pacientes que desenvolvem infecção crônica (Rosen, 2003; Zeisel *et al.*, 2007). Portanto, a resposta das células CD4+ parece determinar a progressão para a fase crônica da infecção (Ishii & Koziel, 2008). As células T CD8+ também apresentam papel importante no controle viral, no entanto, os relatos são controversos em relação ao seu papel na fase crônica da infecção (Thimme *et al.*, 2006; Ishii & Koziel, 2008).

As evidências não permitem afirmar se a persistência da infecção é resultado do escape imune ou da diversidade de *quasispecies*, no entanto, parece que esses fatores, embora não determinem a cronicidade, provavelmente são importantes para manter a infecção crônica (Pawlotsky, 2006).

1.6 Tratamento do Vírus da Hepatite C

Desde a descoberta do HCV, o interferon foi o primeiro antiviral usado na terapia em pacientes portadores de infecção crônica (Zein & Zein, 2002). Entretanto, foram observadas altas frequências de reincidência, sugerindo que poucos pacientes se beneficiavam do tratamento (Lauer & Walker, 2001). Então

foi acrescentada, ao tratamento um antiviral oral, a ribavirina. A introdução de uma terapia combinada, interferon e ribavirina, aumentou a taxa de resposta virológica sustentável (RVS, avaliada seis meses após o término do tratamento) para 38% em pacientes tratados pela primeira vez, e para 49% naqueles que tinham reincidido (Lauer & Walker, 2001; Zein & Zein, 2002).

Um novo interferon foi desenvolvido denominado de interferon peguilado ou PEG-IFN, com a adição de uma molécula de polietilenoglicol ao interferon. Essa nova formulação resultou no prolongamento da ação do fármaco. Com isso, a administração do medicamento passou de três para uma vez semanalmente (Alberti & Benvegnù, 2003).

Atualmente, o tratamento padrão é a combinação do PEG-INF e a ribavirina (Ishii & Koziel, 2008). Em princípio, todos os pacientes com infecção crônica pelo HCV são candidatos à terapia antiviral (Zein & Zein, 2002). No entanto, somente tem indicação para terapia antiviral os pacientes com níveis detectáveis de RNA do HCV, com persistência nos níveis elevados de ALT e biópsia do fígado mostrando fibrose, necrose moderada ou inflamação (Lauer & Walker, 2001; Zein & Zein, 2002). Os pacientes com genótipo 1 são tratados por um ano, enquanto que, com o genótipo 2 ou 3 são tratados por seis meses (Alberti & Benvegnù, 2003). Dentre os pacientes com genótipo 1, 42% a 52% apresentaram RVS, enquanto que, com genótipo 2 ou 3 essa resposta foi de 76% a 82%. Além do genótipo e da carga viral, outras características do hospedeiro como idade, sexo e estágio da fibrose podem influenciar a resposta virológica (Lauer & Walker, 2001; Zein & Zein, 2002; Hadziyannis & Koskinas, 2004; Ishii & Koziel, 2008; Maheshwari *et al.*, 2008).

Como citado anteriormente, as proteínas E2 e NS5B exibem mimetismo com sítios de fosforilação da proteína quinase indutora de INF (PKR), por isso essas seqüências se ligam e inibem a atividade de quinase da PKR (Rehermann, 2000; Farci & Purcell, 2000; Pawlotsky, 2003).

A análise das *quasispecies* associada à resposta ao tratamento mostrou que pacientes com maior complexidade genética do vírus apresentaram menor resposta ao tratamento (Pawlotsky, 2006). Entretanto, alguns estudos não relacionam a diversidade genética do HCV com a resposta, mas sim o grau de viremia antes do tratamento, enquanto que outros trabalhos associam a mesma com as substituições de aminoácidos na região ISDR da proteína NS5A (Gómez

et al., 1999; Farci & Purcell, 2000; Fabrizi *et al.*, 2002; Pawlotsky, 2006). Embora ocorram algumas divergências, os dados sugerem que a diversidade e a complexidade genética das *quasispecies* podem ser um preditor para a resposta ao tratamento com interferon (Farci & Purcell, 2000).

1.7 Hepatite C em Pacientes Renais Crônicos

A infecção pelo vírus da hepatite C ocorre com frequência elevada em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC), que são submetidos ao tratamento de hemodiálise e transplante renal. A prevalência de anti-HCV nesses pacientes varia entre as diferentes regiões geográficas (Figura 9). Uma revisão publicada por Rahnavardi e colaboradores (2008), com dados desde 1999, mostrou taxas variando de 4% em hemodialisados no Reino Unido até 71% no Kuwait (Rahnavardi *et al.*, 2008).

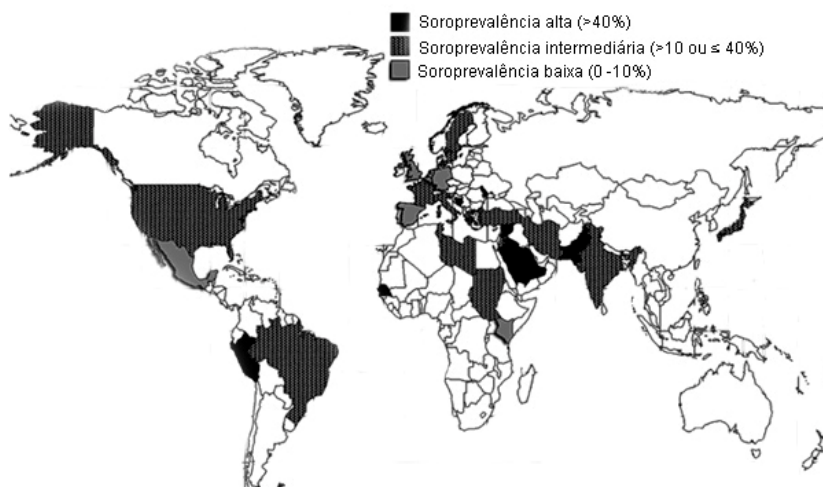


Figura 9: Soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite C em pacientes em hemodiálise, baseada em dados publicados desde 1999

Fonte: Rahnavardi *et al.*, 2008

No Brasil, estudos realizados em pacientes em hemodiálise retratam taxas de prevalência variando de 8,4% a 65% (Quadro 1).

Quadro 1: Estudos de prevalência da infecção pelo vírus da hepatite C em pacientes em hemodiálise no Brasil

Região	Local	Período	N	Prevalência (%)	Referência
Sul	Rio Grande do Sul	1998	74	39,2	Carvalho et al., (1999)
	Porto Alegre	2000	128	31,2	Dotta et al., (2003)
	Porto Alegre	2003	1261	29,1	Gomes et al., (2006)
	Santa Catarina	1996-1998	813	33,3	Ono-Nita et al.,(2004)
Sudeste	Rio de Janeiro	1991	331	64,7	Vanderborgh et al., (1995)
	Belo Horizonte	2000	434	20,3	Busek et al., (2002)
	São Paulo	1997-1998	281	11,7	Moreira et al., (2003)
Nordeste	Salvador	1992-1994	395	23,8	Santana et. al., (2001)
	Salvador	2002	1243	10,5	Silva et al., (2006)
	Recife	2002	257	8,4	Albuquerque et al., (2005)
	Recife	2002	250	8,4	Mello et al., (2007)
Centro-Oeste	Fortaleza	1997	752	52	Medeiros et al., (2004)
	Tocantins	2001	100	13	Souza et al., (2003)
	Mato Grosso	2002-2005	433	16,9	Santos & Souto (2007)
	Campo Grande	2003	163	13	Freitas et al., (2008)
	Góias	2002	1095	15,4	
		1993	153	28,2	
	Goiânia	1996	282	34,7	Carneiro et al., (2005)
		1999	451	37,8	
		2002	795	16,5	
	Brasília	2002	761	13,1	Trevizoli, (2004)

O genótipo 1 é predominante em pacientes em hemodiálise no Brasil (Moraes, 2001; Busek *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2006; Espírito-Santo *et al.*, 2007; Lemos *et al.*, 2008), sendo o subtipo 1a o mais prevalente (Moraes, 2001; Moreira *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2007; De Paula *et al.*, 2007; Espírito-Santo *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2008).

O risco da infecção pelo HCV está associado ao número de transfusões de sangue e, principalmente, à duração do tratamento de diálise (Meyers *et al.*, 2003). A transmissão nosocomial tornou-se importante causa da infecção pelo HCV em unidades de hemodiálise, podendo ocorrer durante os procedimentos dialíticos, por contato com superfícies ambientais, medicamentos, luvas ou objetos contaminados. Esses dados enfatizam a importância da adoção de procedimentos de controle de infecção nessas unidades (Sulowicz *et al.*, 2007; Rahnavardi *et al.*, 2008).

Traçar a história natural da hepatite C em pacientes em hemodiálise tem sido difícil, porque as evidências têm mostrado que a infecção pelo vírus usualmente é assintomática, com evolução longa e silenciosa. Os hemodialisados são considerados imunocomprometidos, e isso se deve a uremia crônica (Fabrizi *et al.*, 2003; Rahnavardi *et al.*, 2008). Outra característica relevante é que esses pacientes apresentam os níveis de ALT freqüentemente normais. Esse marcador parece não estar diretamente relacionado com a doença hepática crônica (Contreras *et al.*, 2007; Terrault & Adey, 2007). A prevalência de fibrose ou cirrose é baixa, ocorrendo em torno de 5 a 32% (Fabrizi *et al.*, 2004; Kalia *et al.*, 2007). Os pacientes com viremia, isto é RNA HCV positivos, podem apresentar anticorpos não detectáveis, em função da fraca resposta humoral do renal crônico (Meyers *et al.*, 2003). Trevizoli e colaboradores (2008) observaram em pacientes em hemodiálise, que os níveis da ALT, da carga viral e da fibrose se mostraram significativamente menor, se comparados com os dos pacientes com função renal normal (Trevizoli *et al.*, 2008).

Nos hemodialisados, a carga viral usualmente é baixa quando comparada com a dos pacientes não urêmicos (Furusyo *et al.*, 2000; Fabrizi *et al.*, 2003). Alguns autores investigaram o efeito da hemodiálise em relação à carga viral. Os soros dos pacientes foram quantificados por PCR antes e depois desse tratamento e, foi possível verificar partículas virais adsorvidas na superfície interna da membrana do filtro durante a diálise, sugerindo ser a causa da redução de partículas circulantes do HCV nesses pacientes (Hayashi *et al.* 1997; Mizuno *et al.* 2002; Fabrizi *et al.*, 2003). É evidente que mais estudos longitudinais são necessários para melhor entender essa dinâmica da carga viral na população dialisada (Fabrizi *et al.*, 2003). Já entre as sessões de hemodiálise, foi observado um aumento dos níveis da viremia, o que pode ser explicado pela meia vida das partículas do HCV liberadas das células infectadas (Furusyo *et al.*, 2000; Fabrizi *et al.*, 2003).

Embora não existam critérios bem definidos para o tratamento da hepatite C em pacientes em hemodiálise, o uso do interferon tem apresentado bons resultados. Apesar de pouco tolerado, devido aos diversos efeitos colaterais, estudos têm mostrado uma média de RVS entre 30% e 41% e, de 26% nos pacientes com genótipo 1. Esses resultados têm sido melhores quando

comparados aos de pacientes não dialisados tratados somente com interferon (Terrault & Adey, 2007; Gordon *et al.*, 2008). O uso da terapia combinada interferon mais ribavirina tem sido utilizada, mas com algumas restrições, como a redução na dose da ribavirina e o tratamento da anemia com eritropoietina (Russo *et al.*, 2003; Fabrizi *et al.*, 2007; Kalia *et al.*, 2007; Okoh *et al.*, 2008). Os pacientes tratados que apresentam RVS antes do transplante, geralmente conseguem manter essa resposta após o transplante (Terrault & Adey, 2007).

Em pacientes transplantados, a terapia com interferon é contra-indicada devido a efeitos colaterais significantes, como a rejeição ao transplante e a fraca resposta ao tratamento por causa da imunossupressão do paciente. Portanto, o recomendado para esses pacientes é o tratamento antes do transplante, a fim de minimizar as complicações pós-transplante (Fabrizi *et al.*, 2007; Kalia *et al.*, 2007; Terrault & Adey, 2007; Okoh *et al.*, 2008).

1.8 Justificativa

Considerando a alta prevalência da infecção pelo vírus da hepatite C em pacientes portadores de insuficiência renal crônica, que são submetidos ao tratamento de hemodiálise, a pesquisa do RNA HCV nessa população é de grande importância na adoção de medidas de controle da infecção pelas autoridades de saúde pública.

O estudo de caracterização molecular do HCV tem importantes implicações epidemiológicas, além de auxiliar no controle da infecção crônica, no prognóstico e no tratamento da infecção (Zein, 2000; Lauer & Walker, 2001). Indivíduos infectados com genótipo 2 ou 3 respondem melhor ao tratamento do que os indivíduos infectados com os genótipos 1 e 4 (Chevaliez & Pawlotsky, 2007).

No Brasil, estudos têm mostrado uma prevalência de anti-HCV variando de 8,4% a 65% (Vanderborght *et al.*, 1995; Mello *et al.*, 2007). Alguns trabalhos foram realizados no sentido de caracterizar o vírus nessa população (Busek *et al.*, 2002; Perez *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006; Carneiro *et al.*, 2007; de Paula Farah *et al.*, 2007; Espírito-Santo *et al.*, 2007). No entanto, no Distrito Federal, não há dados sobre a determinação dos genótipos do HCV em pacientes renais crônicos. Com vistas em ampliar o conhecimento sobre os genótipos que circulam nesse grupo, esperamos contribuir para um melhor entendimento da variabilidade genética do HCV em nossa região, o que certamente terá implicações no controle e na conduta ao tratamento antiviral.

O estudo da variabilidade genética da glicoproteína do envelope E2 pode fornecer informações relevantes para o desencadeamento da resposta imune contra o vírus. Estudos têm demonstrado que HVR1, possivelmente, contém epitopos para as células B, os quais participam na formação de anticorpos neutralizantes (Sobolev *et al.*, 2000). No Brasil, há uma carência de dados sobre a variabilidade genética dessa região em pacientes renais crônicos. Portanto, esse trabalho visa também analisar a variabilidade genética de HVR1 do HCV em pacientes em hemodiálise anti-HCV negativos e, comparar os dados obtidos em pacientes cronicamente infectados anti-HCV reagentes (controle). Com os resultados alcançados, esperamos contribuir para um melhor entendimento da variabilidade genética do HCV nesses grupos, e compreender melhor a interação

entre o HCV e o hospedeiro, gerando, assim, informações sobre possíveis implicações dessa variabilidade na patogenicidade da infecção viral.

2. OBJETIVOS

Esta tese tem como objetivo geral analisar a variabilidade genética do HCV em pacientes em hemodiálise no Brasil Central.

Objetivos específicos:

- Identificar os genótipos e subtipos do HCV em amostras de pacientes renais crônicos submetidos ao tratamento de hemodiálise no DF;
- Comparar os genótipos e subtipos obtidos para diferentes regiões do genoma viral, a saber: região 5' UTR e NS5B;
- Caracterizar a variabilidade genética em HVR1, no gene E2, em amostras do genótipo 1, subtipo 1a do HCV em pacientes em hemodiálise anti-HCV negativos;
- Comparar a diversidade genética da HVR1 do HCV nos pacientes em hemodiálise, (grupo IRC) e pacientes cronicamente infectados com função renal normal (grupo controle).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes Estudados

A primeira etapa da presente tese consiste na genotipagem do HCV em pacientes renais crônicos em hemodiálise no Distrito Federal. O grupo estudado foi formado por 66 pacientes anti-HCV e RNA HCV positivos, obtidos de um estudo de prevalência realizado anteriormente, com 761 pacientes em tratamento hemodialítico, correspondendo a 86% da população total (Trevizoli, 2004). Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Governo do Distrito Federal.

O grupo de pacientes estudados apresentou idade de 24 a 77 anos (média 46 anos; mediana 45), e dentre os quais, 47% eram do sexo feminino e 53% do masculino.

Na segunda etapa da tese, foi realizado o estudo de variabilidade genética do HCV em 10 pacientes renais crônicos anti-HCV não reagentes, mas RNA HCV positivos (grupo IRC), provenientes de Goiânia-GO (Carneiro *et al.*, 2005), sendo oito do sexo masculino e dois do feminino, com idade variando de 19 a 71 anos. Os isolados do HCV foram caracterizados como genótipo 1, subtipo 1a.

Para o grupo controle, foram selecionados 10 pacientes anti-HCV e RNA HCV positivos, que apresentavam infecção crônica pelo HCV, com função renal normal, e não receberam qualquer tratamento, pareados por sexo, idade e genótipo/subtipo viral em relação ao grupo anterior. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás.

3.2 Amostras Testadas

Para a realização da análise molecular do HCV, foi utilizada uma alíquota do soro de cada paciente. As amostras se encontravam armazenadas a -80°C. Apesar delas estarem bem acondicionadas e estocadas, na primeira etapa deste estudo, foi possível testar 95,6% (66 /69) das amostras anti-HCV e RNA HCV positivas, (Trevizoli, 2004), em função do volume insuficiente de soro em três delas.

3.3.Extração do RNA

O RNA foi extraído utilizando-se reagentes comerciais QIAamp Viral RNA (Qiagen), conforme as instruções do fabricante.

3.4 Transcrição Reversa

Após a extração do RNA, a reação de transcrição reversa foi realizada num volume final de 20 μ L. Inicialmente, uma solução contendo 5 μ L de RNA viral, 0,2 μ g de iniciador randômico (*Promega*), 0,5 mM de cada dNTP (*Invitrogen*) e água MilliQ para um volume final de 13 μ L, foi mantida a 65°C por 5 minutos e, imediatamente, transferida para um recipiente com gelo por um minuto. Em seguida, foram adicionados tampão 5X *first-strand buffer* (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM Mg Cl₂), 100 mM de ditioneitol (DTT), 200 U da enzima SuperScript™ transcriptase reversa (*Invitrogen*) e 40 unidades (U) de inibidor de ribonuclease (*Invitrogen*). Esta reação foi inicialmente incubada a 25°C por 5 minutos, e depois a 55°C por 60 minutos. A reação foi interrompida, com a inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C.

3.5 Reação em Cadeia da Polimerase

O cDNA obtido foi amplificado por *nested* PCR, utilizando-se iniciadores específicos para as regiões 5' UTR e NS5B visando à caracterização dos genótipos e subtipos do HCV. Na primeira reação de amplificação para a região 5' UTR, foram usados iniciadores externos P7/P8 e, na segunda reação, para a amplificação do fragmento entre os nucleotídeos 316 e 63, os iniciadores internos P10/P17. O Quadro 2 mostra as seqüências dos iniciadores usados para amplificação da região 5' UTR (Ginabreda *et al.*, 1997). A PCR foi realizada num volume final de 50 μ L, contendo 5 μ L de cDNA, 2,5 mM de dNTPs, 50 mM de MgCl₂, 0,7 μ M de iniciadores externos (P7/P8) e 2 U da enzima *Taq DNA Polimerase* (*Invitrogen*). As amostras foram amplificadas em um termociclador (*PTC-100 Research INC*), usando-se os seguintes parâmetros de amplificação: um ciclo de desnaturação de 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, e extensão final a

72°C por 7 minutos. Um µL do produto da PCR foi submetido à segunda reação de amplificação com os iniciadores internos (P10/P17), nas mesmas condições e usando-se os mesmos parâmetros de amplificação.

As amostras amplificadas foram analisadas em gel de agarose 1% e coradas com brometo de etídeo. O fragmento esperado para o produto amplificado da região 5' UTR foi de 254 pb.

Quadro 2: Seqüência dos iniciadores usados para amplificação da região 5'UTR do genoma do HCV.

Iniciadores	Seqüência (5'→ 3')	Posição no genoma
P7	CACTCCCCTGTGAGGAAGTACTGTC	28 - 62
P8	ATGGTGCACGGTCTACGAGACCTCC	319 - 357
P10	TTCACGCAGAAAGCGTCTAGCC	63 - 84
P17	GGGCACTCGCAAGCACCCCTATCAGG	292 - 316

P7/P8 = iniciadores externos P10/P17 = iniciadores internos

Para a região NS5B, foram usados os iniciadores externos S1/AS1 na primeira reação de amplificação e, na segunda, os iniciadores internos S2/AS2. O Quadro 3 apresenta as seqüências dos iniciadores utilizados para amplificação da região NS5B (Sandres-Sauné *et al.*, 2003). A reação de amplificação foi realizada com 5 µL de cDNA, 2,5 mM de dNTPs e 0,25 µM de iniciadores externos (S1/AS1) e 2 U de *Taq DNA polimerase*, num volume final de 50 µL. Todas as amostras foram submetidas à amplificação utilizando como parâmetros uma desnaturação inicial de 95°C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, 54°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto, e de uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Dois µL do produto da primeira amplificação foram submetidos a uma segunda reação usando os iniciadores internos (S2/AS2), nas mesmas condições de amplificação, com 25 ciclos. As amostras amplificadas foram analisadas em gel de agarose 1% e coradas com brometo de etídeo. O fragmento esperado para o produto amplificado para região NS5B foi de 367 pb.

Quadro 3: Seqüência de iniciadores usados para amplificação da região NS5B do genoma do HCV.

Iniciadores	Seqüência (5' → 3')	Posição no genoma
S1	TGG GGT TCT CGT ATG ATA CCC	8245 - 8265
AS1	CCT GGT CAT AGC CTC CGT GAA	8616 - 8636
S2	GAT ACC CGC TGC TTT GAC TC	8259 - 8278
AS2	CCT CCG TGA AGG CTC TCA G	8607 - 8625

S1/AS1 = iniciadores externos A2/AS2 = iniciadores internos

Para o estudo de variabilidade genética, as amostras foram amplificadas por *nested* PCR utilizando-se iniciadores específicos para a região E2, incluindo HVR1. Na primeira reação, foram usados os iniciadores externos ES1/EAS1 e, na segunda, os iniciadores internos ES2/EAS2. Os iniciadores foram desenhados, utilizando o programa FastPCR (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>). O Quadro 4 mostra as seqüências dos iniciadores utilizados para amplificação da região do envelope.

Quadro 4: Seqüência dos iniciadores usados para amplificação da região E2 do genoma do HCV.

Iniciadores	Seqüência (5' → 3')	Posição no genoma
ES1	TCG GCC CTC TAC GTG GGG GAC	1164 - 1185
EAS1	CCT CTC AGG ACA GCC TGA AGA GT	1689 - 1722
ES2	CCT TCT CTC CCA GGC GCC ACT GG	1216 - 1238
EAS2	GGC CGT GCT ATT GAT GTG CCA ACT	1596 - 1620

ES1/EAS1 = iniciadores externos EA2/EAS2 = iniciadores internos

A primeira reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo 4 µL de cDNA, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µL dos iniciadores (ES1/EAS1) e 2 U de *Taq DNA polimerase*. A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 1 minuto; 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos; seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Na segunda amplificação, foram usados 2 µL do produto de PCR gerado na primeira reação, 0,2mM de dNTPs, 0,5µl dos iniciadores (ES2/EAS2) e 2 U de *Taq DNA polimerase*, seguindo as mesmas condições de amplificação descritas acima.

As amostras amplificadas foram analisadas em gel de agarose 1% e coradas com brometo de etídeo. O fragmento esperado para o produto amplificado para região E2 (HVR1) foi de 405 pb.

As amostras não amplificadas foram consideradas negativas para a presença do RNA HCV, de acordo com a metodologia utilizada.

Para evitar contaminação, a extração e a transcrição do RNA, a preparação dos reagentes pré-PCR, amplificação do DNA e a eletroforese em gel dos produtos da PCR foram realizadas em salas separadas e, para monitorar possível contaminação, foram sempre incluídos controles negativos, em todos os procedimentos.

3.6 Sequenciamento

3.6.1 Precipitação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram inicialmente precipitados adicionando meio volume de acetato de amônio 7,5 M e 2,5 volumes de etanol absoluto. As soluções foram mantidas a -80°C por 30 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 14000 rpm por 40 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 100 µL de etanol a 70%. Os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e os tubos mantidos a 37°C para secagem. Finalmente, foram adicionados 15 µL de água MilliQ em cada tubo.

3.6.2 Sequenciamento automático

Os produtos da amplificação precipitados foram submetidos ao seqüenciamento automático utilizando-se iniciadores internos sense P17, para seqüenciamento da região 5' UTR, e S2, para seqüenciamento da região NS5B.

As reações de seqüenciamento nucleotídico foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, empregando-se o *Kit RT-Terminator*, no Sistema *Molecular Dynamics MegaBACE 500 plus (GE Healthcare)*, e na plataforma de seqüenciamento da EMBRAPA – CENARGEN usando o *Kit ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* versão 3.1 (*Applied Biosystems*).

3.6.3 Análise das seqüências

A qualidade das seqüências obtidas na reação de seqüenciamento foi verificada pelo programa PHRED (Ewing & Green, 1998). A homologia das seqüências nucleotídicas foi determinada pelo programa *HCV-Blast (Basic Local Alignment Search Tool)*, disponível no site *HCV Databases* (<http://hcv.lanl.gov>). Nesse programa, as seqüências obtidas foram alinhadas com seqüências do HCV disponíveis no banco genômico *HCV Databases* (<http://hcv.lanl.gov>).

3.6.4 Análise filogenética

A análise filogenética da região NS5B foi realizada utilizando o conjunto de programas PHYLIP versão 3.6 (Felsenstein, 1981). As seqüências obtidas (328 nt) foram alinhadas com as de referências dos subtipos 1a, 1b e 3a, obtidas no site do *HCV Database* (<http://hcv.lanl.gov>), utilizando-se o programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994).

A distância evolutiva foi calculada empregando o programa *DNAdist*, pelo método de correção de dois parâmetros de Kimura (Kimura, 1980). As relações filogenéticas foram determinadas pelo método de *Neighbor Joining*, que permitem verificar a proximidade evolutiva entre as seqüências analisadas. Além disso, pôde-se determinar a relação entre as seqüências originárias do DF com as de referência do HCV. A reprodutibilidade de cada ramo foi estimada por um valor de *bootstrap* de 1000 réplicas. A árvore foi obtida pelo programa *Tree View1.6.6* (Page, 1996). A seqüência consenso do subtipo 4a foi utilizada como grupo externo.

3.7 Clonagem

Para o estudo da variabilidade genética em HVR1, os produtos amplificados foram clonados com o intuito de analisar as *quasispecies* encontradas nos grupos IRC e controle.

Inicialmente, os produtos de PCR amplificados foram purificados utilizando-se o *Wizard SV Gel and PCR Clean up System (Promega)*, conforme as instruções do fabricante.

A reação de ligação dos produtos de PCR purificados ao plasmídeo *pGEM[®]-T easy (Promega)* foi realizada seguindo as instruções do fabricante.

A bactéria *Escherichia coli* da linhagem DH5 α foi transformada pelo plasmídeo, por choque térmico. Inicialmente, 10 μ L da solução contendo o plasmídeo foram incubados com 300 μ L de células competentes, em gelo por 40 minutos. Em seguida, as células foram submetidas a 42°C por 2 minutos, em banho-maria, e novamente transferidas para o banho de gelo por 5 minutos. Foram adicionados ao tubo do tipo *ependorf*, 700 μ L de meio líquido 2 x YT (1,6 mg/ml de triptona, 1,0 mg/mL de extrato de levedura e 85,6 mM de NaCl), e em seguida incubados a 37°C por 1 hora. Após esse tempo, o tubo foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm. As bactérias foram espalhadas em placas de Petri contendo meio sólido 2xYT, com 1,67 η mol de IPTG, 800 η g de X-Gal e 100 mg/mL de ampicilina.

As placas de Petri com as bactérias transformadas foram incubadas por aproximadamente 12 horas em estufa a 37°C. Os clones transformantes foram selecionados e incubados nas mesmas condições sob agitação em meio líquido 2xYT, contendo 100 mg/mL de ampicilina. Em seguida, o DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega)*, seguindo as instruções do fabricante.

O DNA foi seqüenciado em ambas as direções utilizando-se iniciadores internos ES2/EAS2, como descrito no item 3.6.2.

3.8 Análise das Quasispecies do HCV

Para a análise da variabilidade genética da HVR1, foram seqüenciados de 10 a 15 clones de cada amostra. As seqüências nucleotídicas obtidas foram

alinhas usando o programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994), em conjunto com a seqüência referência H77-H21 (número de acesso AF011753). As seqüências deduzidas de aminoácidos da posição 384 a 410 foram obtidas a partir do alinhamento das seqüências de nucleotídeos.

3.9 Análise da Variabilidade Genética

As seqüências das *quasispecies* do HCV obtidas do grupo de pacientes renais crônicos e do grupo controle foram analisadas quanto à diversidade genética utilizando-se o programa MEGA 4.1. A diversidade genética foi calculada entre as *quasispecies* de cada amostra e entre todas as amostras de cada grupo. A proporção da diversidade de HVR1 nos dois grupos e o percentual de sítios conservados e variáveis também foram calculados pelo programa MEGA 4.1.

Para determinar a variabilidade genética em cada posição de aminoácido em HVR1, entre os dois grupos analisados, foi utilizado o cálculo de entropia de Shannon do programa de entropia (*Entropy program on the Los Alamos National Security website*) disponível no sítio: <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/ENTRPY/entropy.html>.

3.10 Análise das Substituições Não Sinônimas e Sinônimas

Para avaliar as substituições não sinônimas (dN) e sinônimas (dS) em HVR1 do HCV entre os dois grupos estudados, a taxa (dN/dS) de substituições foi estimada utilizando-se o programa SNAP de análise do Los Alamos (*Analysis Program on Los Alamos National Security website*) disponível no sítio: <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/SNAP/SNAP.html>.

As seqüências de aminoácidos em HVR1 das amostras do grupo IRC e do grupo controle foram submetidas ao método PCA (*Principal Components Analysis*) utilizando-se o programa Weblogo 2.8.2, disponível no sítio: <http://weblogo.berkeley.cdu>. A representação gráfica resultante dessa análise mostra a distribuição dos tipos de aminoácidos em HVR1, onde o tamanho de cada letra em cada posição representa a freqüência do aminoácido na respectiva coluna. Os aminoácidos hidrofóbicos (FIWYLVMPCA) foram representados pela

cor vermelha, os neutros (GTS) pela cor verde e os hidrofílicos (KQNHEDR) pela cor azul (Black & Mould, 1991).

3.11 Análise Filogenética

As 195 seqüências de *quasispecies* obtidas foram usadas na construção da árvore filogenética dos grupos IRC e controle. Para a análise filogenética, foi usado um fragmento de 81 pb, referente à região HVR1 do HCV. A árvore filogenética foi construída pelo método Neighbor-joining e 1000 réplicas por meio do programa MEGA 4.1.

3.12 Análise Estatística

A análise estatística foi aplicada aos resultados obtidos no estudo da variabilidade genética de HVR1 do HCV nos grupos IRC e controle. Para tanto, foi utilizado o teste de Wilcoxon, com intervalo de confiança de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Genotipagem do HCV em pacientes em hemodiálise no Distrito Federal

4.1.1 Detecção do RNA HCV

Das 66 amostras analisadas, 77,3% (51/66) foram positivas para a região 5' UTR do genoma viral. Em 82,3% (42/51) destas, o RNA foi amplificado também para a região NS5B do HCV (Figura 10).

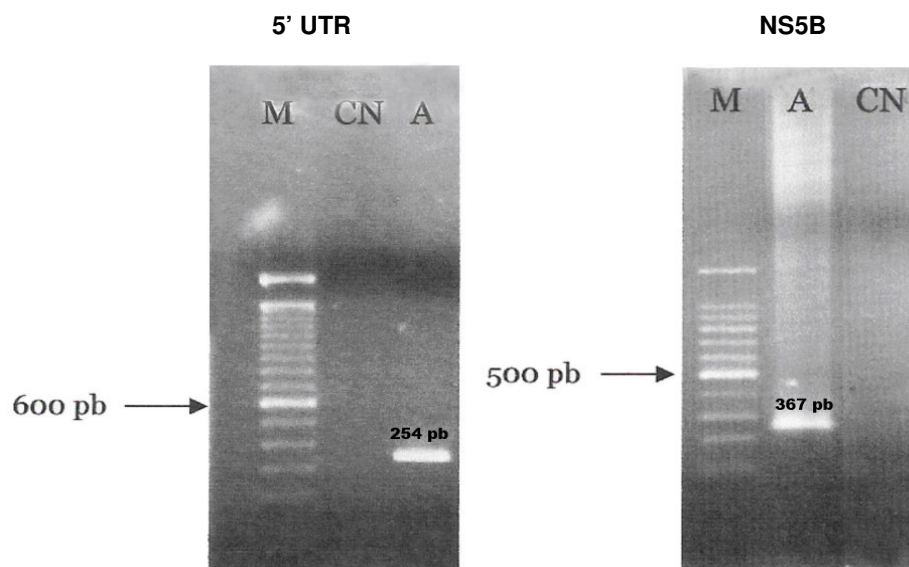


Figura 10: Amplificação da região 5' UTR e NS5B do HCV.

Eletroforese do produto de PCR da região 5' UTR e NS5B do HCV, em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo. As colunas representadas pela letra A correspondem aos fragmentos esperados para as duas regiões 5' UTR (~ 254 pb) e NS5B (~ 367 pb). M marcador DNA ladder 100 pb e CN controle negativo.

4.1.2 Genotipagem do HCV

As amostras positivas para o RNA do HCV foram caracterizadas por seqüenciamento. Das 51 amostras genotipadas para a região 5' UTR, 90,2% eram do genótipo 1, subtipos 1a, (82,3%), 1b (5,9%) e 1a/1b (2,0%). As amostras restantes eram do genótipo 3, subtipo 3a (9,8%) (Tabela 1).

Dentre as 42 amostras amplificadas para a região NS5B, 90,5% eram do genótipo 1, subtipo 1a, e 9,5% do subtipo 3a (Tabela 1, Figura 11) . Pela análise filogenética da região NS5B do HCV, todas as amostras agruparam com as seqüências de referência dos genótipos/subtipos correspondentes, com um valor mínimo de *bootstrap* de 70%. Assim, as seqüências de referência do mesmo genótipo/subtipo formaram grupos bem caracterizados, evidenciando a confiabilidade da análise filogenética.

Tabela 1: Genotipagem do HCV pelo seqüenciamento das regiões 5' UTR e NS5B em pacientes em hemodiálise no DF.

Região	Genótipo/Subtipo				
	N	1a	1b	1a/1b	3a
5' UTR	51	42 (82,3%)	3 (5,9%)	1 (2,0%)	5 (9,8%)
NS5B	42	38 (90,5%)	-	-	4 (9,5%)

A concordância observada na genotipagem para as regiões 5' UTR e NS5B foi de 100% para os genótipos, e de 92,5% (40/42) para os subtipos. Somente duas amostras apresentaram resultados discordantes, sendo caracterizadas como subtipo 1b para a região 5' UTR e como 1a para a região NS5B. Das nove amostras que foram amplificadas e seqüenciadas somente para a região 5' UTR, seis eram do subtipo 1a, uma do subtipo 1b, uma do subtipo 3a, e em uma amostra caracterizada como do genótipo 1, o subtipo não foi identificado com precisão (1a/1b).

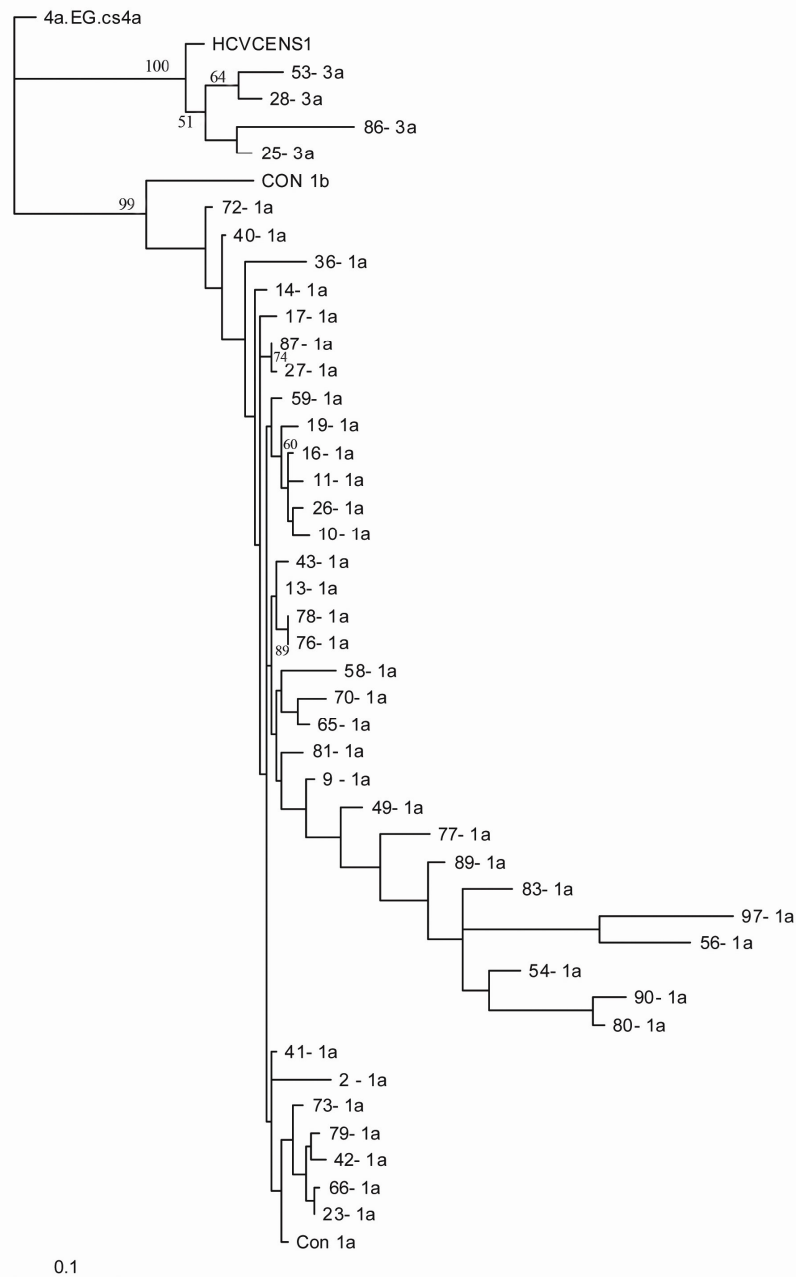


Figura 11: Análise filogenética da região NS5B do HCV em amostras de pacientes em hemodiálise no Distrito Federal. Árvore de máxima verossimilhança enraizada com HCV 4a como grupo externo. Os valores nos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* calculados pelo método *neighbor joining* com fator de correção de 2 parâmetros de Kimura em 1000 réplicas. São mostrados valores de *bootstrap* acima de 70%. O valor da barra de escala no canto esquerdo inferior da figura representa a distância genética em substituições por nucleotídeo do fragmento analisado.

4.2 Variabilidade Genética do HCV

4.2.1 Amplificação de HVR1

As 10 amostras do grupo IRC e do controle foram amplificadas por *nested* PCR para a região do envelope, incluindo a região HVR1 (nt 1491 a 1571), conforme descrito na metodologia. As amostras amplificadas apresentaram um fragmento de aproximadamente 405 pb após análise em gel de agarose a 1% (Figura 12)

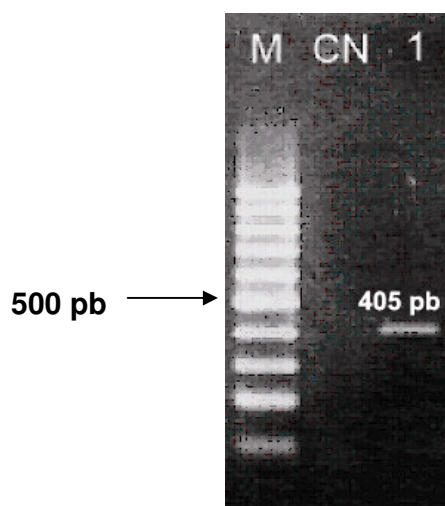


Figura 12: Amplificação da região do envelope do HCV

Eletroforese do produto de PCR da região do envelope do HCV em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. M=marcador DNA ladder 100 pb; 1=fragmento esperado para a região do envelope e CN=controle negativo.

4.2.2 Caracterização da variabilidade genética do HCV em pacientes em hemodiálise (Grupo IRC)

Para a análise da variabilidade genética da região HVR1 do HCV, foram obtidos 10 a 15 clones de cada amostra. Estes clones foram seqüenciados e, a partir do alinhamento das seqüências, foi possível observar variações nucleotídicas em 56 posições, quando comparadas à seqüência de referência H77 (AF011753). Do total de 116 clones seqüenciados, foram verificadas poucas *quasispecies* dentro de cada amostra, e essas se apresentaram homogêneas, apesar da variabilidade em relação à seqüência referência H77. No geral, as amostras apresentaram variações nucleotídicas em várias posições; entretanto, as posições 39 (G/A), 42 (T/G) e 54 (T/C) foram conservadas em todas as amostras (Figura 13).

As seqüências deduzidas de aminoácidos compreenderam a HVR1 completa, que se estende do aminoácido 384 ao 410. A Figura 14 apresenta as seqüências de aminoácidos de HVR1, mostrando as trocas conservativas e não conservativas detectadas entre as amostras. A maior parte das mudanças de nucleotídeos detectada resultou em trocas não conservativas de aminoácidos. Também foram observadas algumas trocas nucleotídicas silenciosas. As posições 389 glicina (G) e 390 glicina (G) foram conservadas em todas as amostras. Dentre as substituições de aminoácidos, as posições 385 treonina (T), 387 valina (V), 398 glicina (G), 399 leucina (L), 402 leucina (L), 406 glicina (G), 409 glutamina (Q) e 410 asparagina (N) foram conservadas na maioria das amostras.

Códon Referência	Posição do aminoácidos em HVR1																								Nº DE CLONES			
	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407		408	409	410
Amostra 1	E	T	H	V	T	G	G	N	A	G	R	T	A	G	L	V	G	L	L	L	T	P	G	A	K	Q	N	11
1A*	A	I			S					A	Y	N	A	R		H	N		F								8	
1C	A	I			S					A	Y	N	A	R		H	N		F								1	
1D	A	I			S					A	Y	N	A	R		H	N		F								1	
1H	A	I			S					A	Y	N	A	R		H	D		F								1	
Amostra 2																											11	
2H*		T						A			H	A	A	K		T	S		F	S	V		P	N			1	
2E		T					A	V			H	A	A	K		T	S		F	S	V		P	N			1	
2A		T					A				H	A	A	K		T	S		F	S	V		P	N			3	
2B		T					A	V			H	A	A	K		T	S		F	S	V		P	N			5	
2G		T					A	V			H	A	A	K		T	S		F	S	V		P	N			1	
Amostra 3																											12	
3C*		T					A				H	A	A	L		T	S		F	S	A		P	N			10	
3R		T					A				H	A	A	L		T	S		F	S	A		P	N			1	
3N		T					S	C	R	S	R	T			P	H	Q	P		L	S		P	Q	P	E	1	
Amostra 4																											12	
4P*		T					A	V			H	A	A	K		T	S		F	S	A		P	N			7	
4C		T		D			A	V			H	A	A	K		T	S		F	S	V		P	N			1	
4F		T					A	V			H	A	A	K	D		T	S		F	S	V		S			1	
4K		T					A	V			H	A	A	K		T	S		F	S	A		P	N			1	
4L		T					A	V			H	A	A	K		T	S		F	S	V		P	N			1	
4M		T					A	V			H	A	A	R	A	S	P	A	S	Q	R	A	P	N	R		1	
Amostra 6																											15	
6B*		T					A	V			H	A	A	M		T	S		F	S	V		P	N			13	
6A		T					A	V			H	A	A	K		T	S		F	S	V		P	N			1	
6L		T					A	V			H	A	A	M		T	S		F	S	V		P	N			1	
Amostra 8																											11	
8P*		T					A	V			H	A	A	K		T	S		F	S	V		P	N			5	
8E		T					A	V			H	A	A	K		T	S		F	S	V	G	P	K	Q	N	5	
8S		T					A	V			H	A	A	K		T	S		F	S	V	R	P	Q	H		1	
Amostra 9																											10	
9B*		T					A	V			H	A	A	K		T	S		F	S	V		P	N			9	
9H	A	T					A	V			H	A	A	K		T	S		F	S	V		P	N			1	
Amostra 20																											12	
20B*		I					A	V			H			S		A				V	R		P	R			7	
20C		F					A				H			S		A				V	R		P	R			4	
20D		F					V				H			S		A				V	R		P	R			1	
Amostra 22																											12	
22K*	A	I									A	Y	N	A	R		H	N		F							8	
22B	A	I					S				A	Y	N	A	R		H	N		F							2	
22E	A	I					S				A	Y	N	A	R		H	N		F				E			1	
22J	A	I					S				A	Y	N	A	R		H	N		F							1	
Amostra 26																											10	
26B*		Y	T		S							A	I			V	A	N		F	S		S	R			9	
26T		Y	T		S							A	I			V	A	N		F	S		S	R			1	

Figura 14. Sequências de aminoácidos de HVR1 do HCV deduzidas das 10 amostras dos pacientes renais crônicos (Grupo IRC) em relação à sequência H-77(AF011753). Cada linha representa o alinhamento dos aminoácidos das *quasispecies* comparados à sequência referência. As substituições não-conservativas de aminoácidos estão destacadas em vermelho. Os espaços em cinza representam resíduos de aminoácidos concordantes com a sequência referência.

A Tabela 2 mostra a seqüência referência de aminoácidos da região HVR1 e a freqüência de trocas de aminoácidos presentes em cada posição analisada no grupo IRC. As posições 389 e 390 foram cem por cento conservadas; enquanto que, a posição 397 apresentou um maior número de troca de aminoácidos entre as seqüências analisadas.

Tabela 2: Freqüência de aminoácidos presentes em cada posição de HVR1 do HCV nas seqüências analisadas do grupo IRC.

Aa	Seqüência	Grupo HCV/ Renal crônico									
384 - 1	E	E-93 80,17%	A-23 19,83%								
385 - 2	T	T-115 99,10%	A-1 0,90%								
386 - 3	H	T-71 61,20%	I-30 25,90%	Y-10 8,60%	F-5 4,30%						
387 - 4	V	V-105 90,50%	T-10 8,60%	D-1 0,90%							
388 - 5	T	T-83 71,50%	S-33 28,50%								
389 - 6	G	G-116 100,00%									
390 - 7	G	G-116 100,00%									
391 - 8	N	A-90 77,60%	V-21 18,10%	S-5 4,30%							
392 - 9	A	V-62 53,40%	A-53 45,70%	C-1 0,90%							
393 - 10	G	G-92 79,30%	A-23 19,80%	R-1 0,90%							
394 - 11	R	H-82 70,70%	Y-23 19,80%	R-10 8,60%	S-1 0,90%						
395 - 12	T	A-80 69,00%	N-23 19,80%	T-12 10,30%	R-1 0,90%						
396 - 13	T	A-77 66,40%	T-23 19,80%	I-10 8,60%	V-5 4,30%	R-1 0,90%					
397 - 14	A	K-44 38,00%	R-24 20,70%	M-14 12,00%	S-12 10,30%	L-11 9,50%	A-10 8,60%	T-1 0,90%			
398 - 15	G	G-113 97,40%	A-2 1,70%	D-1 0,90%							
399 - 16	L	L-103 88,80%	V-10 8,60%	P-2 1,70%	S-1 0,90%						
400 - 17	V	T-69 59,50%	H-24 20,70%	A-22 19,00%	P-1 0,90%						
401 - 18	G	S-69 59,48%	N-32 27,58%	G-12 10,30%	D-1 0,90%	Q-1 0,90%	A-1 0,90%				
402 - 19	L	L-102 87,90%	F-12 10,30%	S-1 0,90%	P-1 0,90%						
403 - 20	L	F-97 83,60%	L-13 11,20%	S-6 5,20%							
404 - 21	T	S-74 63,80%	T-23 19,80%	V-17 14,60%	L-1 0,90%	Q-1 0,90%					
405 - 22	P	V-45 38,80%	P-33 28,40%	A-19 16,40%	R-13 11,20%	G-5 4,30%	S-1 0,90%				
406 - 23	G	G-109 93,90%	P-5 4,30%	A-1 0,90%	R-1 0,90%						
407 - 24	A	P-78 67,20%	A-23 19,80%	S-10 8,60%	K-5 4,30%						
408 - 25	K	K-49 42,20%	N-36 31,00%	R-22 19,00%	Q-7 6,00%	S-1 0,90%	E-1 0,90%				
409 - 26	Q	Q-108 93,00%	N-5 4,30%	H-1 0,90%	R-1 0,90%	P-1 0,90%					
410 - 27	N	N-114 98,20%	S-1 0,90%	E-1 0,90%							

A numeração da coluna esquerda representa as posições de aminoácidos na seqüência referência e, a da direita à freqüência de aminoácidos encontrada nas amostras. O número depois de cada aminoácido representa o número total de clones que possuía o respectivo resíduo. Ao lado, encontra-se o percentual de cada resíduo nos 116 clones analisados.

4.2.3 Caracterização da variabilidade genética do HCV nos pacientes com hepatite C crônica (Grupo controle)

Para a análise da variabilidade genética da região HVR1 do HCV foram obtidos 10 clones de cada amostra. Estes clones foram seqüenciados e, a partir do alinhamento das seqüências, foi possível observar variações nucleotídicas em 68 posições, quando comparadas à seqüência de referência H77 (AF011753). Do total de 100 clones seqüenciados, foram verificadas várias *quasispecies* dentro de cada amostra. As amostras apresentaram variações nucleotídicas diferentes entre si (Figura 15).

A Figura 16 apresenta as seqüências de aminoácidos deduzidas, mostrando as trocas conservativas e não conservativas detectadas entre as amostras. A maior parte das mudanças de nucleotídeos detectada resultou em trocas não conservativas de aminoácidos; também foram observadas algumas trocas nucleotídicas silenciosas. Pode-se verificar que as posições 385 treonina (T), 389 glicina (G) e 406 glicina (G) foram conservadas em todas as amostras. Dentre as substituições de aminoácidos, as posições 387 valina (V), 388 treonina (T), 390 glicina (G) e 409 glutamina (Q) foram conservadas na maioria das amostras.

Códon	Posição do aminoácidos em HVR1										Nº DE CLONES																			
	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393		394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	
Referência	E	T	H	V	T	G	G	N	A	G	R	T	T	A	G	L	V	G	L	L	L	T	P	G	A	K	Q	N		
Amostra 29																														10
29A	D							T			H	A	A	L	R		T	S	I	F	S	T							5	
29E	D							T			Q	A	A	L	R		T	S	I	F	S	T							1	
29K	D							V	T					L											S	R			1	
29M	G							T			Q	A	S	R															1	
29N	D							T						L															1	
29P	D							V	T					L												S			1	
Amostra 31																													10	
31B								T			H	A	V	K	F	S	S	S	F	F	S	L	L	P	P				3	
31E	G							T			H	A	Q																1	
31F	G							T			H	A	Q																4	
31H	G							T			H	A	Q																1	
31N	G							A	V	T	H	A	A	R															1	
Amostra 32																													10	
32E								A	S	A	A	A	W	R															4	
32F	Q							A	S	A	H	A	A	Q															5	
32J								A	S	A	H	A	A	Q															1	
Amostra 33																													10	
33A								T	V		L		L	S		F	A	R	I	F	S	L	P	P	R	S			1	
33C								A		S	H	L	G																1	
33E								A		A	R	A	F	T															1	
33H								T		Y	A	V	G	S															1	
33I								T			A	L	G	S	F	T													1	
33R								T		S	H	L	G	T															2	
33T								T			A	V	G	S															1	
33U								T	V		L		L	S		A	R	F	F	S	L	P	P	R	R	S			1	
33Z								A		S	Y	A	R	A	F	T													1	
Amostra 34																													10	
34A								T		L	D	I	L																1	
34B								A		S	Y	N	R																2	
34C								T		L	D	M	L																1	
34D								T		A	Y		S	I		T	R	Y											1	
34E								T		A	Y	N	T	F	T	R													1	
34F								T		N	A	Y	N	R															1	
34I								T		A	S	Y	N	R															1	
34J								T		Y	A																		1	
34M								T		Y	A																		1	
Amostra 36																													10	
36A										S	Q	A		R		F	A	S	F	A	S								3	
36B								T		A	A	M																	1	
36C								S		H	A	A	R																5	
36O								S		Y	A	A	M	R	F	T	S	I	F	S	S								1	
Amostra 38																													10	
38A																													3	
38C																													5	
38J																													1	
38Q																													1	
Amostra 41																													10	
41B																													4	
41C																													1	
41D																													4	
41J																													1	
Amostra 43																													10	
43A																													9	
43B																													1	
Amostra 44																													10	
44E																													8	
44F																													1	
44T																													1	

Figura 16. Sequências de aminoácidos de HVR1 do HCV deduzidas das 10 amostras do grupo de pacientes com infecção crônica (controle) e a de referência H-77(AF011753). Cada linha representa o alinhamento do aminoácido da *quasispecies* comparadas à sequência referência. As substituições de aminoácidos não-conservativas estão destacadas em vermelho. Os espaços em branco representam resíduos de aminoácidos concordantes

A Tabela 3 mostra a seqüência referência de aminoácidos da região HVR1 e a freqüência de trocas de aminoácidos presentes em cada posição analisada no grupo controle. As posições 385, 389 e 406 foram cem por cento conservadas; enquanto que, as posições 386, 397 e 405 apresentaram uma maior troca de aminoácidos entre as seqüências analisadas.

Tabela 3: Freqüência de aminoácidos presentes em cada posição de HVR1 do HCV nas seqüências analisadas do grupo controle.

Aa	Seqüência	Grupo Controle - HCV cronicamente infectado																	
384-1	E	E-55	55,00%	Q-14	14,00%	T-10	10,00%	D-9	9,00%	G-8	8,00%	N-3	3,00%	R-1	1,00%				
385-2	T	T-100	100,00%																
386-3	H	H-30	30,00%	T-19	19,00%	R-14	14,00%	F-10	10,00%	M-10	10,00%	L-6	6,00%	Y-6	6,00%	Q-5	5,00%		
387-4	V	V-97	97,00%	I-2	2,00%	A-1	1,00%												
388-5	T	T-90	90,00%	S-10	10,00%														
389-6	G	G-116	100,00%																
390-7	G	G-99	99,00%	A-1	1,00%														
391-8	N	T-40	40,00%	A-38	38,00%	S-19	19,00%	V-3	3,00%										
392-9	A	A-74	74,00%	V-11	11,00%	S-10	10,00%	T-5	5,00%										
393-10	G	G-78	78,00%	A-13	13,00%	S-9	9,00%												
394-11	R	H-49	49,00%	R-22	22,00%	Y-13	13,00%	L-111	11,00%	Q-5	5,00%								
395-12	T	T-55	55,00%	A-39	39,00%	N-4	4,00%	D-2	2,00%										
396-13	T	A-54	54,00%	V-16	16,00%	L-15	15,00%	T-13	13,00%	M-1	1,00%	I-1	1,00%						
397-14	A	R-26	26,00%	L-16	16,00%	S-14	14,00%	Q-12	12,00%	W-9	9,00%	M-8	8,00%	K-7	7,00%	G-6	6,00%	N-2	2,00%
398-15	G	G-77	77,00%	R-15	15,00%	S-3	3,00%	A-2	2,00%	I-2	2,00%	T-1	1,00%						
399-16	L	L-67	67,00%	F-32	32,00%	I-1	1,00%												
400-17	V	T-41	41,00%	S-29	29,00%	A-29	29,00%	V-1	1,00%										
401-18	G	G-42	42,00%	S-41	41,00%	R-6	6,00%	T-6	6,00%	N-5	5,00%								
402-19	L	L-60	60,00%	I-24	24,00%	F-14	14,00%	P-1	1,00%	V-1	1,00%								
403-20	L	F-78	78,00%	L-21	21,00%	S-1	1,00%												
404-21	T	S-53	53,00%	T-22	22,00%	A-16	16,00%	D-6	6,00%	V-2	2,00%	L-1	1,00%						
405-22	P	P-30	30,00%	L-20	20,00%	S-17	17,00%	R-15	15,00%	T-7	7,00%	V-5	5,00%	M-5	5,00%	A-1	1,00%		
406-23	G	G-100	100,00%																
407-24	A	P-56	56,00%	A-42	42,00%	S-2	2,00%												
408-25	K	K-64	64,00%	S-17	17,00%	R-14	14,00%	Q-3	3,00%	N-2	2,00%								
409-26	Q	Q-99	99,00%	R-1	1,00%														
410-27	N	N-78	78,00%	D-13	13,00%	K-8	8,00%	S-1	1,00%										

A numeração da coluna esquerda representa as posições de aminoácidos na seqüência referência e, a da direita a freqüência de aminoácidos encontrada nas amostras. O número depois de cada aminoácido representa o número total de clones que possuía o respectivo resíduo. Ao lado, encontra-se o percentual de cada resíduo nos 100 clones analisados.

4.2.4 Comparação da variabilidade genética de HVR1 do HCV entre o grupo de pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) e o grupo com infecção crônica pelo HCV (controle)

- ***Análise filogenética das quasispecies dos grupos IRC e controle***

Para caracterizar a variação genética entre os grupos IRC e controle, a análise filogenética foi realizada usando-se um fragmento de HVR1 de 81 pb de 98 seqüências do grupo IRC e de 97 seqüências do grupo controle.

A análise filogenética revelou que a maior parte das amostras formou grupos distintos com as respectivas *quasispecies*. No grupo IRC, as *quasispecies* das amostras 2, 3, 4, 6, 8 e 9 formaram um grupo; assim como, a maioria das *quasispecies* das amostras 1 e 22, que formaram outro grupo (Figura 17).

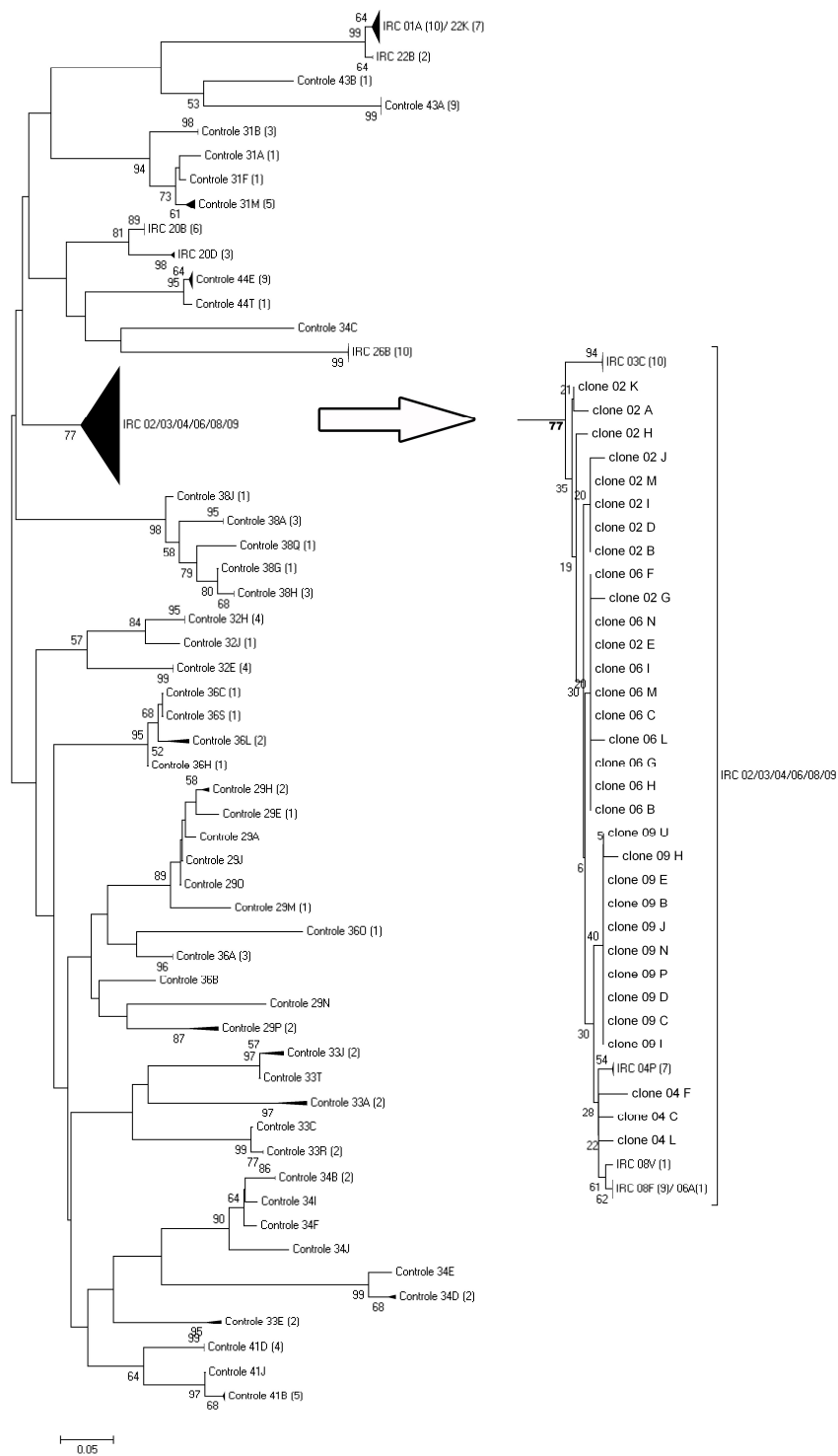


Figura 17: Análise filogenética dos grupos IRC e do grupo controle. São mostrados valores de bootstrap acima de 50%. Os valores nos ramos correspondem aos valores de bootstrap calculados pelo método *neighbor joining* com fator de correção de 2 parâmetros de Kimura em 1000 réplicas. O valor da barra de escala no canto esquerdo inferior de cada figura representa a distância genética em substituições por nucleotídeo do fragmento analisado.

- **Análise da diversidade genética em HVR1**

Para os dois grupos incluídos no estudo, foi calculada a frequência de sítios conservados e variáveis. Observou-se diferença significativa entre os grupos IRC e controle, tanto em relação aos sítios conservados (40,74%, IC 95%: 0,3004-0,5144; 16,05%, IC 95%: 0,0806-0,2404), quanto aos variáveis (59,26%, IC 95%: 0,4856-0,6996; 83,95%, IC 95%: 0,7596-0,9194) (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação de sítios polimórficos em HVR1 do HCV entre os grupos de pacientes renais crônicos (IRC) e controle.

Número de sítios (n=81)	Polimorfismo			
	IRC	IC 95%	Controle	IC 95%
Conservados	33 (40,74%)	0,3004-0,5144	13 (16,05%)	0,0806-0,2404
Variáveis	48 (59,26%)	0,4856-0,6996	68 (83,95%)	0,7596-0,9194

Os sítios polimórficos foram calculados pelo programa MEGA 4.1

A análise da diversidade genética foi calculada entre as *quasispecies* de cada amostra (intra-amostra) e em relação ao total de amostras dos dois grupos. Identificou-se uma maior diversidade no grupo controle entre as *quasispecies* detectadas em cada amostra (0,1117), em relação às *quasispecies* do grupo IRC (0,0103); bem como entre as amostras dos dois grupos (0,3496 para o grupo controle e 0,2323 para o grupo IRC). A proporção da diversidade detectada entre as *quasispecies* e amostras foi maior no grupo IRC (0,9555) em relação ao controle (0,6806) ($p=0,0004$) (Tabela 5).

Tabela 5: Análise da diversidade genética de HVR1 do HCV entre os grupos de pacientes renais crônicos (IRC) e controle.

Grupos	Diversidade		
	Intra-amostra	Total por grupo	Proporção *
IRC	0,0103 (EP 0,0027)	0,2323 (EP 0,0410)	0,9555 (EP 0,0108)
Controle	0,1117 (EP 0,0126)	0,3496 (EP 0,0438)	0,6806 (EP 0,0259)

Proporção foi calculada entre a diversidade das *quasispecies* e as amostras do grupo IRC e do grupo controle. * Diferença estatisticamente significativa ($p=0,0004$). EP: erro padrão; Diversidade calculada pelo programa MEGA 4.1

Para investigar se a diferença de variabilidade em HVR1 do HCV encontrada entre os grupos IRC e controle foi devida à pressão seletiva direcionada pelo sistema imune, a razão das taxas de substituições não sinônimas e sinônimas foi calculada para ambos os grupos. Como apresentado na Tabela 6, quando comparados os dois grupos em relação às substituições sinônimas, não houve diferença significativa; já a média das taxas de substituições não sinônimas diferiu entre os mesmos ($p < 0,05$). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre a razão das taxas de substituições não sinônimas e sinônimas dos grupos IRC e controle, sugerindo a presença de uma pressão seletiva similar entre os dois grupos.

Tabela 6: Comparação da média das substituições não sinônimas e sinônimas em HVR1 do HCV entre os grupos de pacientes renais crônicos (IRC) e controle.

Grupos	Substituições dos aminoácidos		
	dS	dN	dN/dS
IRC	0,6746	0,3847	0,5703
Controle	0,6534	0,3478	0,5323
Valor de p	0,6229	0,0355	0,2475

dS média das taxas substituições sinônimas

dN média das taxas substituições não sinônimas

dN/dS foram calculadas pelo programa SNAP

sítio <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/SNAP/SNAP.html>.

- **Análise da variabilidade de aminoácidos em HVR1**

A freqüência de clones que apresentaram variações entre os 27 aminoácidos da região HVR1 do HCV nos grupos IRC e controle está representada na Figura 18. Pode-se observar que a posição 389 foi a única conservada nos dois grupos; enquanto que, nas demais posições, ocorreu diferentes graus de variabilidade entre os clones. Nas colunas com asterisco, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, sendo que nas posições 386, 388, 392, 395, 401, 406, 407 e 408, as mudanças foram mais freqüentes entre os clones do grupo IRC; enquanto que, nas posições 384, 397, 398, 399, 402 e 410, as trocas foram mais freqüentes entre os clones do grupo controle.

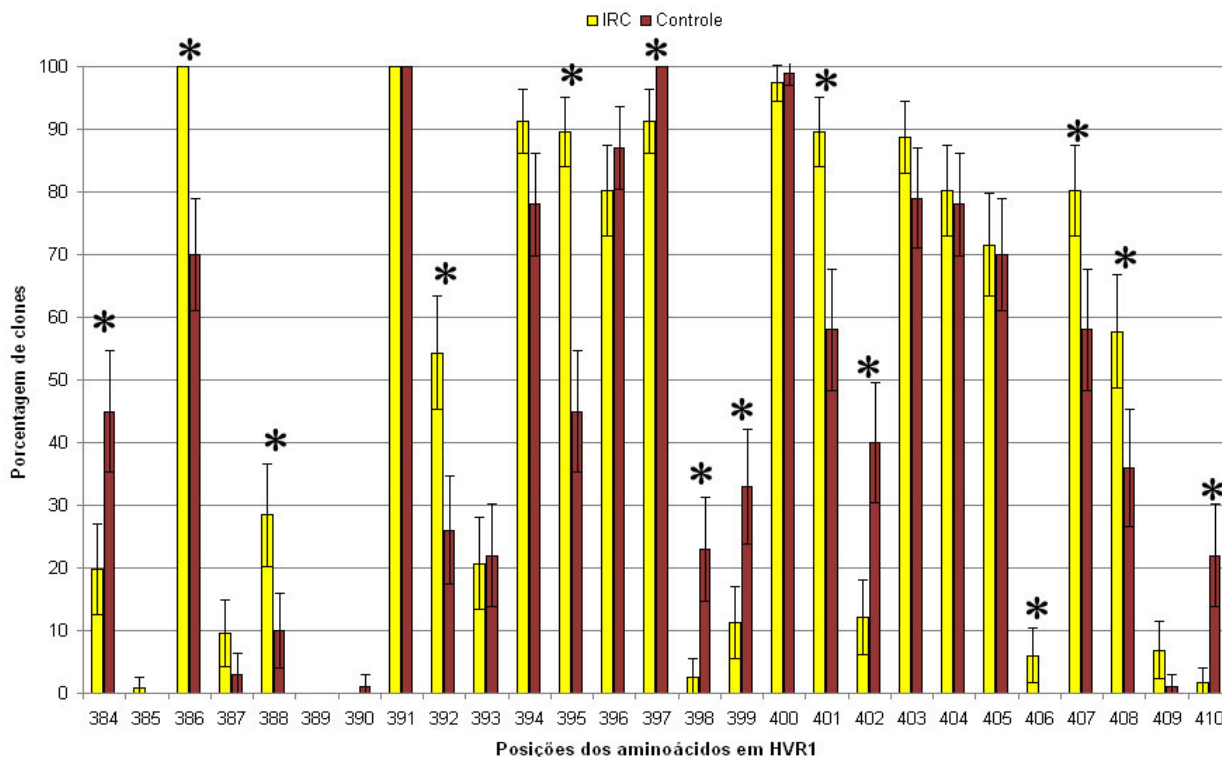


Figura 18: Freqüência de clones com variações de aminoácidos na região HVR1 do HCV entre os grupos de pacientes renais crônicos (IRC) e controle. * $p < 0,05$.

A variabilidade dos aminoácidos encontrada na HVR1 do HCV nos grupos IRC e controle foi estimada pelo cálculo de entropia de Shannon (Figura 19). Nas posições 1(384), 3(386), 8(391), 11(394), 14(397), 15(398), 17(400), 22(405) e 27(410), a variabilidade dos aminoácidos foi significativamente maior no grupo controle quando comparada ao grupo IRC. Em relação ao grupo IRC, somente a posição 5(388) apresentou uma maior variabilidade em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

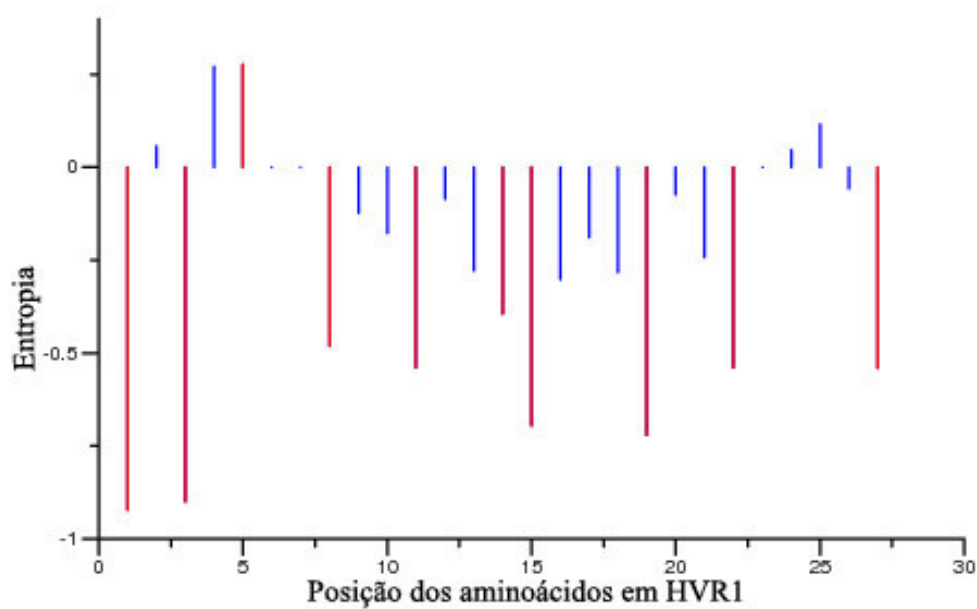


Figura 19: Gráfico de entropia de Shannon calculada para HVR1 do HCV nos grupos de pacientes renais crônicos (IRC) e controle. As barras acima da linha zero correspondem ao grupo IRC, e as amostras abaixo, ao grupo controle. As barras em vermelho significam variabilidade estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, e as barras em azul não apresentam significância. O cálculo de entropia de Shannon está disponível no sítio <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/ENTRPY/entropy.html>.

Devido à região HVR1 do HCV ter importância imunogênica, a distribuição dos tipos de aminoácidos quanto à hidrofobicidade foi analisada, sendo os mesmos classificados em hidrofóbicos, neutros e hidrofílicos. A análise da hidrofobicidade revelou-se similar entre os dois grupos. Na Figura 20, é possível observar que as posições 2, 5, 6, 7 e 23 foram ocupadas exclusivamente por resíduos neutros, como treonina (T), serina (S) e glicina (G); já as posições 16, 19 e 20 pelos resíduos hidrofóbicos, como leucina (L), valina (V), fenilalanina (F) e isoleucina (I). Finalmente, as posições 26 e 27 apresentaram apenas os seguintes resíduos hidrofílicos: glutamina (Q), asparagina (N), ácido aspártico (D) e lisina (K). As demais posições foram ocupadas pelos três tipos de aminoácidos, constituindo posições variáveis.

IRC



Controle

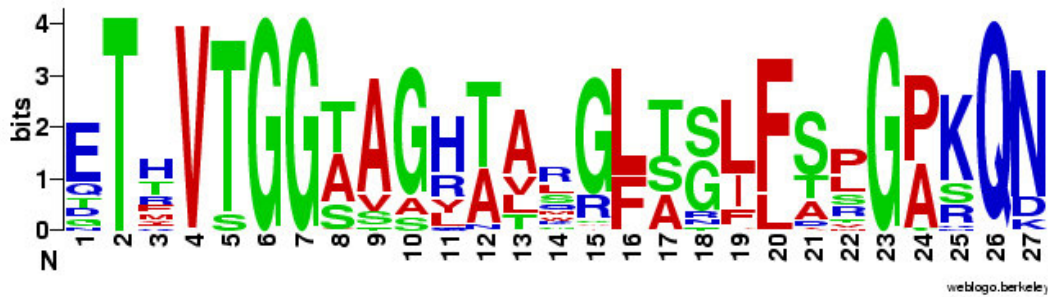


Figura 20: Comparação dos resíduos de aminoácidos de HVR1 do HCV entre os grupos de pacientes renais crônicos (IRC) e controle. Hidrofóbicos (FIWYLVMPCA), representado na cor vermelho, hidrofílicos (KQNHEDR), na cor azul e neutros (GTS) na cor verde. Para o método PCA foi utilizado o programa Weblogo 2.8.2 disponível no site <http://weblogo.berkeley.edu>

5. DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo sobre a identificação dos genótipos/subtipos do HCV em pacientes renais crônicos em hemodiálise no Distrito Federal, que tem importantes implicações epidemiológicas, além de ser útil no prognóstico e no tratamento da infecção. Indivíduos infectados com os genótipos 2 e 3 do HCV respondem melhor ao tratamento que aqueles infectados com os genótipos 1 e 4, e esse aumento na resposta virológica é clinicamente importante para conduzir o tratamento (Chevaliez & Pawlotsky, 2007).

Para o nosso conhecimento, não existem dados sobre a caracterização da HVR1 do HCV em pacientes renais crônicos. Assim, este poderá também contribuir para expandir o conhecimento sobre a diversidade do HCV nesta população.

5.1 Caracterização molecular do HCV em pacientes em hemodiálise no Distrito Federal

Na primeira parte deste trabalho, foi realizada a caracterização molecular do HCV em pacientes em hemodiálise no Distrito Federal, os quais apresentaram previamente os marcadores anti-HCV e RNA HCV (Trevizoli, 2004). Neste estudo, observou-se que, das 66 amostras testadas, 77,3% (51/66) foram positivas para o RNA HCV, e 22,7% (15/66) foram negativas. Esses resultados negativos podem ser explicados pelas diferentes metodologias empregadas no presente estudo e naquele conduzido por Trevizoli (2004), como a extração/transcrição reversa e os iniciadores usados na PCR, bem como pela baixa viremia supostamente encontrada nestes pacientes que poderia ocasionar falso-negativos nesta investigação, ou ainda a ocorrência de falso-positivos quando da detecção prévia, pois os resultados das amostras RNA HCV negativas, assim como daquelas positivas apenas para a região 5' UTR (negativas para NS5B), foram confirmados neste trabalho.

Das 51 amostras RNA HCV positivas para a região 5' UTR, 82,3% (42/51) foram também positivas para a região NS5B do HCV. Apesar da região 5' UTR

ser mais conservada e, conseqüentemente amplificar um maior número de amostras que a região NS5B, estudos têm demonstrado que as duas regiões são apropriadas para amplificação do RNA HCV (Chen & Weck., 2002; Nolte *et al.*, 2003; Sandre-Sauné *et al.*, 2003; Laperche *et al.*, 2005). Similarmente ao presente estudo, Espírito-Santo *et al.* (2007) verificaram uma concordância de 81% nos resultados de amplificação para as regiões 5' UTR e NS5B.

Todas as amostras positivas para o RNA do HCV foram caracterizadas por seqüenciamento para a região 5' UTR, sendo que 90,2% eram do genótipo 1, subtipos 1a, (82,3%), 1b (5,9%) e 1a/1b (2,0%). As demais eram do subtipo 3a (9,8%). Dentre as 42 amostras caracterizadas para a região NS5B, 90,5% eram do genótipo 1, subtipo 1a e, 9,5% do subtipo 3a. Resultados semelhantes ao do presente estudo foram observados por Campiotto *et al.* (2005), em pacientes cronicamente infectados pelo HCV provenientes das cinco regiões geográficas brasileiras, no qual uma maior prevalência do genótipo 1 (64,9%) foi verificada, seguido do genótipo 3 (30,2%).

Similarmente, a genotipagem realizada em doadores de sangue na Região Centro-Oeste demonstrou ser o genótipo 1 o mais prevalente, seguido do genótipo 3 (Martins *et al.*, 2006). No Distrito Federal, índices de 60,9% e 39,1% foram encontrados para os genótipos 1 e 3 (Amorim *et al.*, 2004). Resultados concordantes foram ainda observados em pacientes em hemodiálise (Moraes, 2001; Busek *et al.*, 2002, Moreira *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2006; Espírito-Santo *et al.*, 2007). Assim, a elevada prevalência do genótipo 1 no Brasil torna-se uma preocupação quanto ao tratamento, por esse apresentar uma resposta virológica sustentada em torno de 40% a 50% (Alberti & Benvegnù, 2003; Chevaliez & Pawlotsky, 2007; Maheshwari *et al.*, 2008).

Neste estudo, o subtipo mais prevalente foi 1a (87,2%), seguido do 3a (12,8%), o que diferiu dos dados observados em doadores de sangue no Distrito Federal, nos quais o subtipo 3a (39,1%) foi mais freqüente que 1a (34,1%) e 1b (26,8%) (Amorim *et al.*, 2004). Por outro lado, resultados semelhantes aos da presente investigação foram apresentados por outros autores em pacientes renais crônicos em hemodiálise, sendo o subtipo 1a predominante (Moraes, 2001; Moreira *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2003, Espírito-Santo

et al., 2007).

Para a caracterização dos genótipos, as regiões 5' UTR e NS5B têm-se mostrado igualmente eficientes. No entanto, em relação aos subtipos, a região 5' UTR, por ser muito conservada, não é indicada para a distinção dos subtipos 1a e 1b (Halfon *et al.*, 2001; Laperche *et al.*, 2005), pois essa diferenciação ocorre apenas por um polimorfismo na posição -99 com uma adenina no subtipo 1a e guanina no subtipo 1b (Chen & Weck, 2002). No estudo ora apresentado, a concordância entre os resultados de genotipagem encontrados foi de 100% para os genótipos, e de 92,5% para os subtipos. Apenas duas amostras foram discordantes na subtipagem, tendo sido caracterizadas para a região 5' UTR como subtipo 1b, e para região NS5B como subtipo 1a. Resultados semelhantes foram verificados por Espírito-Santo e colaboradores (2007), ao utilizarem dois métodos de genotipagem: o LiPA para a região 5' UTR e o sequenciamento automático para a região NS5B, encontrando uma concordância de 100% entre os genótipos e 96,2% entre os subtipos. Portanto, a análise filogenética da região NS5B é mais indicada para caracterizar o HCV em estudos epidemiológicos, enquanto a região 5' UTR é bastante utilizada na detecção e genotipagem do HCV, principalmente na prática clínica para definição do esquema terapêutico da hepatite C.

5.2. Diversidade genética em HVR1 do HCV nos grupos IRC e controle

Na segunda parte deste trabalho, foi analisada a variabilidade genética da HVR1 do HCV, em pacientes em hemodiálise, considerados imunocomprometidos e, um grupo controle constituído por pacientes com infecção crônica pelo HCV (controle), considerados imunocompetentes. Para isso, os clones foram amplificados, seqüenciados e as seqüências geradas foram comparadas à de referência H77 para a análise de variações nucleotídicas e dos aminoácidos detectados. Além disso, foram analisadas a diversidade genética e a freqüência de sítios polimórficos variáveis e conservados a partir das seqüências obtidas.

As seqüências de HVR1 apresentaram maior percentual de sítios variáveis (83,95%; IC 95%, 0,7596-0,9194) no grupo controle, quando comparado ao grupo IRC (59,26%; IC 95%, 0,4856-0,6996). Este dado está de acordo com o esperado, visto que a população viral no grupo controle está sujeita a uma maior pressão seletiva pelo sistema imune do que no grupo IRC, considerado imunocomprometido (Farci & Purcell, 2000).

A análise da diversidade das *quasispecies* dentro de cada paciente (intra-amostra) foi menor no grupo IRC (0,0103), quando comparada ao grupo controle (0,1117); assim como a diversidade entre as amostras dos dois grupos (0,2323 para IRC e 0,3496 para o controle). Por outro lado, a proporção entre a diversidade genética encontrada entre as *quasispecies* (intra-amostra) e as amostras foi maior no grupo IRC (0,9555) que no grupo controle (0,6806) ($p=0,0004$), indicando que a população viral no grupo IRC apresentou-se mais homogênea, com uma menor diversidade entre as *quasispecies*, bem como entre as amostras desse grupo; diferentemente do grupo controle, onde uma alta diversidade foi encontrada, tanto entre as *quasispecies*, quanto entre as amostras. O fato do grupo IRC ter apresentado uma menor diversidade entre as *quasispecies* pode ser decorrente dos efeitos da imunossupressão encontrada nos pacientes renais crônicos. Uma população viral mais homogênea sugere que a pressão seletiva imposta sobre as *quasispecies* seja menor, resultando num decréscimo da diversidade dentro da população viral (Farci & Purcell, 2000). Dados semelhantes foram encontrados em pacientes considerados imunocomprometidos, como agamaglobulêmicos (Odeberg *et al.*, 1997), hipogamaglobulinêmicos (Booth *et al.*, 1998), transplantados (Lawal *et al.*, 1997) e indivíduos co-infectados com HIV com CD4+ menor que 50 células/ μ l (Farci & Purcell, 2000), que apresentaram uma baixa diversidade viral. Portanto, esses dados sugerem que, a redução da pressão seletiva imposta pelo sistema imune, nos indivíduos imunocomprometidos, contribua para uma menor variabilidade genética nos vírus circulantes nesses pacientes.

Para o mapeamento dos sítios mais polimórficos na seqüência de HVR1, foi analisada, neste estudo, a freqüência de trocas de aminoácidos presentes nas 27 posições, utilizando-se a seqüência de referência (H77). A comparação foi feita

entre os 116 clones do grupo IRC e os 100 clones do grupo controle. Os resultados mostraram alguns resíduos de aminoácidos conservados entre as seqüências analisadas, e outras posições mais variáveis. As posições 389 e 390 foram altamente conservadas no grupo IRC, enquanto as posições 397 e 405 apresentaram maior variabilidade. No grupo controle, as posições 385, 389 e 406 foram conservadas; já as mais variáveis foram 386, 397 e 405. Assim, foi observado que as posições 397 e 405 se mostraram variáveis nos dois grupos, e este resultado foi semelhante ao relatado por Sherman *et al.* (1996), que investigaram a variabilidade de HVR1 do HCV em pacientes co-infectados com HIV. Lawal *et al.* (1997), ao analisar 259 seqüências de pacientes transplantados e pacientes sem tratamento (controle), encontraram as seguintes posições conservadas: 385, 389, 390, 406 e 410; sendo semelhantes às verificadas na presente tese, exceto a posição 410.

Além disso, no grupo IRC, foi observado também que as posições 385, 387, 398, 406, 409 e 410 apresentaram baixa variabilidade (> 90% de conservação), correspondendo a 29,6% das seqüências de aminoácidos de HVR1. Enquanto que, no grupo controle, foram as posições 387, 388, 390 e 409 conservadas (> 90% de conservação), com 25,9% de sítios conservados. Assim, seis das 27 posições de HVR1 apresentaram sítios conservados entre os dois grupos, sendo a posição 385 com um resíduo treonina (T), 387 valina (V), nas posições 389, 390 e 406 glicina (G) e a glutamina (Q) na posição 409. Resultados semelhantes foram relatados por Sobolev *et al.* (2000), que encontraram a mesma predominância de resíduos nos sítios citados, na análise de 827 seqüências do banco de dados. Gaudy *et al.* (2003) e Sheridan *et al.* (2004) também observaram resultados semelhantes.

A freqüência de mudanças de aminoácidos em algumas posições de HVR1 apresentou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, sendo nas posições 386, 388, 392, 395, 401, 406, 407 e 408 no grupo IRC, e as posições 384, 397, 398, 399, 402 e 410 no grupo controle. Desta forma, pode-se sugerir que a variabilidade genética em HVR1 não é randômica, sendo essa região tolerante a substituições de aminoácidos em algumas posições, provavelmente essa limitação na variabilidade deve ser importante para garantir a entrada do vírus na célula (Gaudy *et al.*, 2003).

A análise da hidrofobicidade de HVR1 do HCV nos grupos IRC e controle demonstrou que determinados sítios tendem a apresentar aminoácidos de carga conservada. Em ambos os grupos, as posições 2, 5, 6, 7 e 23 foram ocupadas por resíduos de aminoácidos neutros; as posições 16, 19 e 20 por resíduos hidrofóbicos, e as posições 26 e 27 por resíduos hidrofílicos. As demais posições continham proporções variadas dos três tipos de resíduos. No grupo controle, foi detectada uma maior variação de hidrofobicidade nas posições 3(386), 14(397) e 22(405), além de terem apresentado uma alta variabilidade de resíduos de aminoácidos. Sobolev *et al.* (2000) e Penin *et al.* (2001) mostraram resultados similares aos do presente estudo. Dados semelhantes também foram observados por Qin *et al.* (2005) que, além das posições supracitadas, identificaram um resíduo neutro na posição 18, um resíduo hidrofílico na posição 25 e um resíduo hidrofóbico na posição 24.

A conservação de resíduos neutros e hidrofóbicos em posições específicas dentro de HVR1 sugere que esses resíduos são importantes para manter a conformação de HVR1 dentro da glicoproteína E2. Enquanto que, os resíduos de aminoácidos localizados nas posições variáveis dessa região parecem estar envolvidos na antigenicidade e em interações moleculares (Penin *et al.*, 2001). Assim, a investigação sobre o perfil antigênico de HVR1 feita por esses autores mostrou que as regiões entre as posições 1 e 13 e entre 19 e 24 apresentaram características antigênicas, enquanto que as posições de 14 a 18 e de 25 a 27 foram identificadas como segmentos não antigênicos. Resultados semelhantes foram encontrados por Chen & Wang (2007) e Alfonso *et al.* (2004) entre os resíduos 1 e 13, e entre 19 e 25; entretanto Gaudy *et al.* (2003) verificaram característica antigênica em HVR1 somente entre os resíduos 16 a 27.

A entropia de Shannon foi estimada para determinar se a variabilidade individual das posições dos códons nas seqüências de HVR1 do HCV difere entre o grupo IRC e o grupo controle. As seqüências do último grupo apresentaram uma maior variabilidade nas posições 1(384), 3(386), 8(391), 11(394), 14(397), 15(398), 17(400), 22(405) e 27(410); enquanto que, no grupo IRC, apenas a posição 5(388) mostrou uma variabilidade maior que no grupo controle. O fato de ter ocorrido uma maior diversidade de *quasispecies* no grupo controle, pode ser

devido à maior pressão seletiva nesta população viral pelo sistema imune.

Assim, a razão entre as taxas de substituições não sinônimas e sinônimas dentro de HVR1 foi calculada para verificar possíveis diferenças na pressão seletiva entre as populações virais nos dois grupos estudados. Observou-se que, apesar da maior variabilidade encontrada no grupo controle, não houve diferença entre a razão das taxas de substituições não sinônimas e sinônimas nos dois grupos. Portanto, pode-se sugerir que, pela metodologia utilizada, a pressão seletiva sofrida pelas populações virais entre os grupos foi semelhante.

Para a análise filogenética, foi construída uma árvore neighbor-joining das *quasispecies* de HVR1 do HCV dos grupos IRC e controle. Para esta análise, foi utilizado um fragmento de 81 pb de 98 seqüências do grupo IRC e 97 seqüências do grupo controle. A maioria das amostras formou agrupamentos distintos com as respectivas *quasispecies*. Interessantemente, as *quasispecies* das amostras 2, 3, 4, 6, 8 e 9 formaram um agrupamento separado das demais, sugerindo transmissão entre os pacientes, assim como, a maioria das *quasispecies* das amostras 1 e 22, que formaram outro grupo. De fato, Carneiro *et al.* (2007) verificaram a ocorrência de transmissão nosocomial nas unidades de hemodiálise, onde os pacientes estudados realizaram tratamento hemodialítico.

Algumas limitações deste estudo devem ser pontuadas. Na primeira parte, apesar das amostras aqui genotipadas ter sido obtidas de um estudo de prevalência realizado anteriormente com 86% da população de pacientes em hemodiálise no Distrito Federal (n=761) (Trevizoli, 2004), não foram registrados os dados referentes a distribuição dos pacientes por unidades, sala e turno de hemodiálise; os quais poderiam ser analisados juntamente com os resultados moleculares visando traçar possíveis rotas de transmissão do HCV na população estudada. Na segunda parte desta tese, uma das principais limitações foi a dificuldade em se desenvolver um estudo longitudinal, que permitiria acompanhar os pacientes e verificar possível evolução na diversidade genética do HCV.

Apesar das limitações deste estudo, o mesmo mostrou a prevalência dos genótipos em pacientes renais crônicos no Distrito Federal. Como mencionado anteriormente, é de grande importância o conhecimento dos genótipos do HCV circulantes, tendo em vista que, a maioria dos casos evolui para a cronicidade, e o genótipo 1, predominante na população estudada, tem importantes implicações

no tratamento, apresentando uma resposta limitada aos antivirais disponíveis atualmente (Chevaliez & Pawlotsky, 2007). Além disso, por meio deste trabalho, ainda foi possível observar diferença na diversidade genética das *quasispecies* entre os pacientes renais crônicos imunocomprometidos, quando comparados aos imunocompetentes, contribuindo para o entendimento sobre a relação entre as formas variantes do HCV e a pressão seletiva gerada pelo sistema imunológico. No entanto, estudos longitudinais são necessários para avaliar a persistência ou não da ausência do marcador anti-HCV nesses pacientes, em função de possível evolução na diversidade genética do HCV.

6. CONCLUSÕES

- O genótipo 1 (90,2%) foi o mais prevalente em pacientes renais crônicos no Distrito Federal, seguido do genótipo 3 (9,8%). Dentre os subtipos, 1a (90,5%) foi dominante, o que corrobora os dados encontrados em pacientes em hemodiálise no Brasil;
- A concordância entre a genotipagem realizada para a região 5' UTR e NS5B foi de 100% para caracterização dos genótipos, e de 92,5% para os subtipos;
- As seqüências da HVR1 do genótipo 1, subtipo 1a do HCV, em pacientes em hemodiálise anti-HCV negativos, apresentaram variações nucleotídicas em 56 posições, quando comparada à de referência (H-77), sendo as posições 39 (G/A), 42 (T/G) e 54 (T/C) conservadas em todas as amostras analisadas. As seqüências deduzidas de aminoácidos foram conservadas nas posições 389 e 390 (glicina), enquanto que a posição 397 mostrou uma maior variabilidade dentre as seqüências analisadas;
- Ao comparar as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos da HVR1 do HCV entre os grupos estudados, verificou-se uma menor diversidade viral no grupo IRC em relação ao controle, tendo em vista os parâmetros aqui analisados.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALBERTI, A. & BENVIGNÙ, L. Management of hepatitis C. *Journal of Hepatology* 38: S104-S118, 2003.
- ALBUQUERQUE, A.C.C.; COELHO, M.R.C.D; LOPES, E.P.A.; LEMOS, M.F.; MOREIRA, R.C. Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients from one center in Recife, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 100 (5): 467-470, 2005.
- ALFONSO, V.; FLICHTMAN, D.M.; SOOKOIAN, S.; MBAYED, A.; CAMPOS, R.H.E. Evolutionary study of HVR1 of E2 in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of General Virology* 85: 39-46, 2004.
- ALI, A. & ZEIN, N.N. Hepatitis C infection: A systemic disease with extrahepatic manifestations. *Cleveland Clinical Journal of Medicine* 72 (11): 1005-1019, 2005.
- ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology* 13 (17): 2436-2441, 2007.
- AMORIM, R.M.S.; OLIVEIRA, C.P.; WYANT, P.S.; CERQUEIRA, D.M.; CÂMARA, G.N.L.; FLORES, L.S.; MARTINS, R.M.B.; MARTINS, C.R.F. Hepatitis C virus genotypes in blood donors from the Federal District, Central Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 99 (8): 895-897, 2004.
- ASSELAH, T.; BIÈCHE, I.; PARADIS, V.; BEDOSSA, P.; VIDAUD, M.; MARCELLIN, P.; LAZARIDIS, K. Genetics, genomics and proteomics: Implications for the diagnosis and the treatment of chronic hepatitis C. *Seminars in Liver Diseases* 27 (1): 13-27, 2007.
- AZEVEDO, H.A.; VILLELA-NOGUEIRA, C.A.; PEREZ, R.M.; SEGADASSOARES, J.A.; TAKAHASHI, C.; GABURO, N.; PESSOA, T.; COELHO, H.S.M. Similar HCV viral load levels and genotype distribution among end-stage renal disease patients on hemodialysis and HCV-infected patients with normal renal function. *Journal of Nephrology* 20: 609-616, 2007.
- BALDO, V.; BALDOVIN, T.; TRIVELLO, R.; FLOREANI, A. Epidemiology of hepatitis C. *Current Pharmaceutical Design* 14: 1646-1654, 2008.
- BARTENSCHLAGER, R. & LOHMANN, V. Replication of hepatitis C virus. *Journal of General Virology* 81: 1631-1648, 2000.
- BARTENSCHLAGER, R.; KAUL, A.; SPARACIO, S. Replication of the hepatitis C virus in cell culture. *Antiviral Research* 60: 91-102, 2003.
- BARTOSCH, B. & COSSET, F-L. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 348:

1-12, 2006.

- BARTOSCH, B.; DUBUISSON, J.; COSSET, F-L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *The Journal of Experimental Medicine* 197 (5): 633-642, 2003.
- BLACK, S.D. & MOULD D.R. Development of hydrophobicity parameters to analyse proteins which bear post- or cotranslational modifications. *Analytical Biochemistry* 193: 72-82, 1991.
- BOOTH, J.C.L.; KUMAR, U.; WEBSTER, D.; MONJARDINO, J.; THOMAS, H.C..Comparison of the rate of sequence variation in the hypervariable region of E2/NS1 region of hepatitis C virus in normal and hypogammaglobulinemic patients. *Hepatology* 27 (1): 223-227, 1998.
- BOWEN, D.G. & WALKER, C.M. The origin of *quasispecies*: cause or consequence of chronic hepatitis C viral infection? *Journal of Hepatology* 42: 408-417, 2005.
- BRANCH, A.D.; STUMP, D.D.; GUTIERREZ, J.A.; ENG, F.; WALEWSKI, J.L. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: The alternate reading frame protein / F-Protein, the double – frameshift protein, and others. *Seminars in Liver Diseases* 25 (1): 105-117, 2005.
- BRASS, V.; MORADPOUR, D.; BLUM, H.E. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *International Journal of Medical Sciences* 3 (2): 29-34. 2006.
- BUSEK, S.U.; BABÁ, E.H.; FILHO, H.A.T.; PIMENTA, L.; SALOMÃO, A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, G.C. Hepatitis C and hepatitis B virus infection in different hemodialysis units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 97 (6): 775-778, 2002.
- CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.R.R.; CARRILHO, F.J.; DA SILVA, L.C.; SOUTO, F.J.D.; SPINELLI, V.; PEREIRA, L.M.M.B.; COELHO, H.S.M.; SILVA, A.O.; FONSECA, J.C.; ROSA, H.; LACET, C.M.C.; BERNARDINI, A.P. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 41-49, 2005.
- CARNEIRO, M.A.S.; TELES, S.A.; DIAS, M.A.; FERREIRA, R.C.; NAGHETTINE, A.V.; SILVA, S.A.; LAMPE, E.; YOSHIDA, C.F.T.; MARTINS, R.M.B. Decline of hepatitis C infection in hemodialysis patients in Central Brazil: a ten years of surveillance. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 100 (4): 345-349, 2005.

- CARNEIRO, M.A.; TELES, S.A.; LAMPE, E.; ESPIRITO-SANTO, M.P.; GOUVEIA-OLIVEIRA, R.; REIS, N.R.; YOSHIDA, C.F.; MARTINS, R.M. Molecular and epidemiological study on nosocomial transmission of HCV in hemodialysis patients in Brazil. *Journal of Medical Virology* 79 (9): 1325-1333, 2007.
- CARVALHO, E. Hepatite C em hemofílicos: aspectos epidemiológicos, laboratoriais e clínicos. Dissertação de Mestrado. Brasília DF, 165pp, 1999.
- CARVALHO, M.; BRANCO, P.P.; LUVIZOTTO, M.L.; VALDERRAMA, D.E.; RABONE, S.; DOI, E.; IVANTES, C.; MUZZILLO, D.A. High prevalence of hepatitis C virus infection in chronic hemodialysis patients. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 3 (4): 144-148, 1999.
- CHEN, S.L. & MORGAN, T.R. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *International Journal of Medical Sciences* 3 (2): 47-52, 2006.
- CHEN, S & WANG, Y. Evolutionary study of hepatitis C virus envelope genes during primary infection. *Chinese Medical Journal* 120 (24): 2174-2180, 2007.
- CHEN, Z. & WECK, K.E. Hepatitis C virus genotyping: Interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (9): 3127-3134, 2002.
- CHEVALIEZ, S. & PAWLOTSKY, J-M. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World Journal of Gastroenterology* 13 (17): 2461-2466, 2007.
- CHOO, Q-L.; KUO, G.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362, 1989.
- CONTRERAS, A.M.; RUIZ, I.; POLANCO-CRUZ, G.; MONTEÓN, F.J.; CELI, A.; VÁZQUEZ, G.; GÓMEZ-HERRERA, E.; GARCÍA-CORREA, J.E.; MALE-VELÁZQUEZ, R.; RUELAS-HERNÁNDEZ, S. End-stage renal disease and hepatitis C infection: comparison of alanine aminotransferase levels and liver histology in patients with and without renal damage. *Annals of Hepatology* 6 (1): 48-54, 2007.
- DEHESA-VIOLANTE, M. & NUÑEZ-NATERAS, R. Epidemiology of hepatitis virus B e C. *Archives of Medical Research* 38: 606-611, 2007.
- DE PAULA FARAH, K.; CARMO, R.A.; DE FIGUEIREDO, A.C.M.; SERUFO, J.C.; NOBRE JUNIOR, V.A.; FONSECA DE CASTRO, L.P.; LEITE, V.H.; PINTO SILVA, R.A.; ALVARES, M.C.; CORREA, G.O.; BUSEK, S.C.;

- LAMBERTUCCI, J.R. Hepatitis C, HCV genotypes and hepatic siderosis in patients with chronic renal failure on hemodialysis in Brazil. *Nephrology Dialysis Transplantation* 22 (7): 2027-2031, 2007.
- DIENSTAG, J.L. & MCHUTCHISON, J.G. American gastroenterological association technical review on the management of hepatitis C. *Gastroenterology* 130 (1): 231-264, 2006.
- DOTTA, M.A.; CHEQUER, H.; PEREIRA, J.P.M.; SCHIMITT, V.M.; KRUG, L.; SAITOVITCH, D. Métodos molecular e imunológico no diagnóstico de hepatite C em pacientes em hemodiálise. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 25 (2): 86-94, 2003.
- DUBUISSON, J. Hepatitis C vírus proteins. *World Journal of Gastroenterology* 13 (17): 2406-2415, 2007.
- DUBUISSON, J.; HELLE, F.; COCQUEREL, L. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cellular Microbiology* 10 (4): 821-827, 2008.
- ENOMOTO, N.; SAKUMA, I.; ASAHINA, Y.; KUROSAKI, M.; MURAKAMI, T.; YAMAMOTO, C.; IZUMI, N.; MARUMO, F.; SATO, C. Comparasion if full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. *The Journal of Clinical Investigation* 96 (1): 224-230, 1995.
- ERCILLA, M. & VIÑAS, O. Extrahepatic symptoms of hepatitis C virus infection: relation to autoimmune response. *Nephrology Dialysis Transplantation* 15 (Suppl.8): 24-27, 2000.
- ERENSOY, S. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy. *Journal of Clinical Virology* 21: 271-281, 2001.
- ESPIRITO-SANTO, M.P.; CARNEIRO, M.A.S.; REIS, N.R.S.; KOZLOWSKI, A.G.; TELES, S.A.; LAMPE, E.; YOSHIDA, C.F.T.; MARTINS, R.M.B. Genotyping hepatitis C virus from hemodialysis patients in Central Brazil by line probe assay and sequence analysis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40: 545-550, 2007.
- EWING, B. & GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. *Error Probabilities Genome Research* 8: 186 – 194, 1998.
- FABRIZI, F.; LUNGHI, G.; POORDAD, F.F.; MARTIN, P. Genetic variability of hepatitis C virus in dialysis: The implications. *The International Journal of Artificial Organs* 25 (11): 1034-1048, 2002.
- FABRIZI, F.; BUNNAPRADIST, S.; LUNGHI, G.; MARTIN, P. Kinetics of hepatitis C virus load during hemodialysis: novel perspectives. *Journal of Nephrology* 16 (6): 467-475, 2003.

- FABRIZI, F.; MARTIN, P.; DIXIT, V.; BUNNAPRADIST, S.; DULAI, G. Meta-analysis: effect of hepatitis C virus infection on mortality in dialysis. *Alimentary Pharmacology Therapeutics* 20: 1271-1277, 2004.
- FABRIZI, F.; LUNGI, G.; GANESHAN, S.V.; MARTIN, P.; MESSA, P. Hepatitis C virus infection and the dialysis patient. *Seminars in Dialysis* 20 (5): 416-422, 2007.
- FARCI, P.; BUKH, J.; PURCELL, R.H. The quasispecies of hepatitis C virus and the host immune response. *Springer Seminars Immunopathology* 19: 5-26, 1997.
- FARCI, P. & PURCELL, R.H. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Seminars in Liver Disease* 20 (1): 103-126, 2000.
- FAUQUET, C. M.; MAYO, M.A.; MANILLOFF, J.; DESSELBERGER, U., BALL, L. A. *Virus Taxonomy: The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Elsevier, Ed.) Academic Press, 2006.
- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal Molecular Evolution* 17 (6): 368-376, 1981.
- FERREIRA-GONZALEZ, A. & MITCHELL, L.S. Use of diagnostic testing for managing hepatitis C virus infection. *Seminars in Liver Disease* 24 Suppl. 2: 9-18, 2004.
- FOCACCIA, R.; da CONCEIÇÃO, O.J.; SETTE, H.J.; SABINO, C.; BASSIT, L.; NITRINI, D.R.; LOMAR, A.V.; LORENÇO, R.; SOUZA, F.V. de; KIFFER, C.R.V.; SANTOS, B.; GONZALES, M.P.; ALQUEZAR, A.S.; RISCAL, J.R.; FISHER, D. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2 (6): 269-84, 1998.
- FREITAS, S.Z.; CUNHA, R.V.; MARTINS, R.M.B.; TELES, S.A.; IBANHES, M.L.; MOTTA-CASTRO, A.R.C. Prevalence, genotypes and risk factors associated with hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in Campo Grande, MS, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 103 (4): 405-408, 2008.
- FURUSYO, N.; HAYASHI, J.; ARIYAMA, I.; SAWAYAMA, Y.; ETOH, Y.; SHIGEMATSU, M.; KASHIWAGI, S. Maintenance hemodialysis decreases serum hepatitis C virus (HCV) RNA levels in hemodialysis patients with chronic HCV infection. *The American Journal of Gastroenterology* 95 (2): 490-496, 2000.

- GAUDY, C.; MOREAU, A.; VEILLON, P.; TEMOIN, S.; LUNEL, F.; GOUDEAU, A. Significance of pretreatment analysis of hepatitis C virus genotype 1b hypervariable region 1 sequences to predict antiviral outcome. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (8): 3615-3622, 2003.
- GINABREDA, M.G.P.; YOSHIDA, C.F.T.; NIEL, C. Genomic characterization of Brazilian hepatitis C virus genotypes 1a and 1b. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30: 339-345, 1997.
- GOMES, M.; GIGANTE, L.P.; GOMES, J.; BOSCHETTI, J.; CARVALHO, G. Prevalência da soropositividade do anti-HCV em pacientes dialisados. *Revista de Saúde Pública* 40 (5): 931-934, 2006.
- GÓMEZ, J.; MARTELL, M.; QUER, J.; CABOT, B.; ESTEBAN, J.I. Hepatitis C viral *quasispecies*. *Journal of Viral Hepatitis* 6: 3-16, 1999.
- GORDON, C.E.; UHLIG, K.; LAU, J.; SCHMID, C.H.; LEVEY, A.S.; WONG, J.B. Interferon treatment in hemodialysis patients with chronic hepatitis C virus infection: A systematic review of the literature and meta-analysis of treatment efficacy and harms. *American Journal of Kidney Diseases* 51 (2): 263-277, 2008.
- GREMION, C. & CERNY, A. Hepatitis C virus and the immune system: a concise review. *Reviews in Medical Virology* 15 (4): 235-268. 2005.
- GRETCH, D. Mechanism of interferon resistance in hepatitis C. *The Lancet* 358: 1662-1663, 2001.
- HADZIYANNIS, S.J. & KOSKINAS, J.S. Differences in epidemiology, liver disease and treatment response among HCV genotypes. *Hepatology Research* 29: 129-135, 2004.
- HALFON, P.; TRIMOULET, P.; BOURLIERE, M.; KHIRI, H.; LÉDINGHEN, V.de; COUZIGOU, P.; FERYN, J.M.; ALCARAZ, P.; RENO, C.; FLEURY, H.J.A.; OUZAN, D. Hepatitis C virus genotyping based on 5' noncoding sequence analysis (Trugene). *Journal of Clinical Microbiology* 39 (5): 1771-1773, 2001.
- HAYASHI, H.; OKUDA, K.; YOKOSUKA, O.; KOBAYASHI, S.; YOKOZEBI, K.; OHTAKE, Y.; IRIE, Y. Adsorption of hepatitis C virus particles onto the dialyzer membrane. *Artificial Organs* 21 (10): 1056-1059. 1997.
- HOOFNAGLE, J. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36 (5) (Suppl.1): S21-S29, 2002.
- ICTV 2006. Hepacivirus; www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb.
- ISHII, S. & KOZIEL, M.J. Immune responses during acute and chronic infection

- with hepatitis C virus. *Clinical Immunology* 128: 133-147, 2008.
- JADOUL, M. Epidemiology and mechanisms of transmission of the hepatitis C virus in hemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 15 (Suppl.8): 39-41, 2000.
- KALIA, H.; LOPEZ, P.M.; MARTIN, P. Treatment of HCV in patients with renal failure. *Archives of Medical Research* 38: 628-633, 2007.
- KAPLAN, M.; GAWRIEH, S.; COTLER, S.J.; JENSEN, D.M. Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection: A review of immunological and clinical characteristics. *Gastroenterology* 125: 597-604, 2003.
- KATO, N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Medica Okayama* 55 (3): 133-159, 2001.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16(2): 111 – 120, 1980.
- KRUG, L.P.; LUNGE, V.R.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.K.; CHEINQUER, H.; OZAKI, L.S.; BARROS, S.G.S. Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29: 1629-1632, 1996.
- LAPERCHE, S.; ELGHOZZI, M.H.; MOREL, P.; ASSO-BONNET, M.; LE MARREC, N.; GIRAULT, A.; SERVANT-DELMAS, A.; BOUCHARDEAU, F.; DESCHASEAUX, M.; PIQUET, Y. Is an assay for simultaneous detection of hepatitis C virus core antigen and antibody a valuable alternative to nucleic acid testing? *Transfusion* 45 (12): 1965-1972, 2005.
- LAUER, G.M. & WALKER, B.D. Hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine* 345 (1): 41-52, 2001.
- LAVIE, M.; GOFFARD, A.; DUBUISSON, J. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Current Issues in Molecular Biology* 9: 71-86, 2007.
- LAWAL, Z.; PETRIK, J.; WONG, V-S.; ALEXANDER, G.J.M.; ALLAIN, J-P. Hepatitis C virus genomic variability in untreated and immunosuppressed patients. *Virology* 228: 107-111, 1997.
- LE-GUILLEMETTE-GUILLOU, H.; GAUDY-GRAFFIN, C.; PAYAN, C.; PIVERT, A.; GOUDEAU, A.; LUNEL-FABIANI, F. Genetic diversity of the hepatitis C virus: Impact and issues in the antiviral therapy. *World Journal of Gastroenterology* 13 (17): 2416-2426, 2007.

- LEMOS, L.B.; PEREZ, R.M.; LEMOS, M.M.; DRAIBE, S.A.; SILVA, I.S.; SILVA, A.E.; FERRAZ, M.L. Hepatitis C among predialysis patients: prevalence and characteristics in a large cohort of patients. *Nephron Clinical Practice* 108 (2): c135-140, 2008.
- LINDENBACH, B.D.; EVANS, M.J.; SYDER, A.J.; WÖLK, B.; TELLINGHUISEN, T.L.; LIU, C.C.; MARUYAMA, T.; HYNES, R.O.; BURTON, D.R.; McKEATING, J.A.; RICE, C.M. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309: 623-626, 2005.
- LOHMANN, V.; KÖRNER, F.; KOCH, J-O.; HERIAN, U.; THEILMANN, L.; BARTENSCHLAGER, R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285: 110-113, 1999.
- MAHESHWARI, A.; RAY, S.; THULUVATH, P.J. Acute hepatitis C. *Lancet* 372: 321-332, 2008.
- MARTELL, M.; ESTEBAN, J.I.; QUER, J.; GENESCÀ, J.; WEINER, A.; ESTEBAN, R.; GUARDIA, J.; GÓMEZ, J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: *quasispecies* nature of HCV genome distribution. *Journal of Virology* 66 (5): 3225-3229, 1992.
- MARTINS, R.M.B.; VANDERBORGHT, B.O.M.; YOSHIDA, C.F.T. Hepatitis C virus genotypes among blood donors from different regions of Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 93 (3): 299-300. 1998.
- MARTINS, R.M.B.; TELES, S.A.; FREITAS, N.R.; MOTTA-CASTRO, R.C.; SOUTO, F.J.D.; MUSSI, A.; AMORIM, R.M.S.; MARTINS, C.R.F. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from wide-west region of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48 (1): 53-55, 2006.
- MAYO, M.J. Extrahepatic manifestation of hepatitis C infection. *The American Journal of the Medical Sciences* 325 (3): 135-148, 2002.
- MEDEIROS, M.T.G.; LIMA, J.M.C.; LIMA, J.W.O.; CAMPOS, H.H.; MEDEIROS, M.M.C.; FILHO, J.M.C. Prevalence and associated factors to hepatitis C in hemodialysis patients in Brazil. *Revista de Saúde Pública* 38 (2): 187-193, 2004.
- MELLO, L.A.; MELO-JUNIOR, M.R.; ALBUQUERQUE, A.C.C.; COELHO, M.R.C.D. Hepatitis C serum prevalence in hemodialyzed patients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40 (3): 290-294, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.

- DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA 2008. HEPATITES VIRAIS: o Brasil está atento/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica-3.ed.-Brasília: Ministério da Saúde, 60pg:il.-(Série B. Textos Básicos de Saúde).
- MEYERS, C.M.; SEEFF, L.B.; STEHMAN-BREEN, C.O.; HOOFNAGLE, J.H. Hepatitis C and renal disease: An update. *American Journal of Kidney Diseases* 42 (4): 631-657, 2003.
- MIZUNO, M.; HIGUCHI, T.; YANAI, M.; KANMATSUSU, K.; ESUMI, M. Dialysis-membrane-dependent reduction and adsorption of circulating hepatitis C virus during hemodialysis. *Nephron* 91: 235-242, 2002.
- MONDELLI, M.U.; CERINO, A.; MEOLA, A.; NICOSIA, A. Variability or conservation of hepatitis C vírus hypervariable region 1? Implications for immune responses. *Journal of Biosciences* 28 (3): 305-310, 2003.
- MORAES, C.R. Hepatitis C virus infection in hemodialysis patients and workers. A case-control study in Santa Catarina State dialysis units. *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 43 (2): 66, 2001.
- MOREIRA, R.; PINHO, J.R.R.; FARES, J.; OBA, I.T.; CARDOSO, M.R.; SARACENI, C.P.; GRANATO, C. Prospective study of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients by monthly analysis of HCV RNA and antibodies. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 503-507, 2003.
- NOLTE, F.S.; GREEN, A.M.; FIEBELKORN, K.R.; CALIENDO, A.M.; STURCHIO, C.; GRUNWALD, A.; HEALY, M. Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on analysis of the 5' noncoding region. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (4): 1558-1564, 2003.
- ODEBERG, J.; YUN, Z.; SÖNNERBORG, A.; BJÖR, K.; UHLÉN, M.; LUNDEBERG, J. Variation of hepatitis C virus hypervariable region 1 in immunocompromised patients. *The Journal of Infectious Diseases* 175: 938-943, 1997.
- OLIVEIRA, M.L.; BASTOS, F.I.; SABINO, R.R.; PAETZOLD, U.; SCHREIER, E.; PAULI, G.; YOSHIDA, C.F. Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32 (3): 279-282, 1999.
- OKOH, E.J.; BUCCI, J.R.; SIMOM, J.F.; HARRISON, S.A. HCV in patients with end-stage renal disease. *American Journal of Gastroenterology* 103: 2123-2134, 2008.
- ONO-NITA, S.K.; MORAES, C.R.; CARRILHO, F.J.; PINHO, J.R.R.; BASSIT, L.;

- SILVA, L.C. A prospective study of the prevalence of hepatitis B and C virus co-infection among patients with chronic renal disease under hemodialysis. *Journal of Hepatology* 40: 715-719, 2004.
- PAGE, R. D. M. Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computational Application in Biosciences* 12: 357-358, 1996.
- PAWLOTSKY, J-M. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 36 (5) (Suppl.1): S65-S73, 2002.
- PAWLOTSKY, J-M. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clinics in Liver Disease* 7: 45-66, 2003.
- PAWLOTSKY, J-M. Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 299: 261-284, 2006.
- PENIN, F.; COMBET, C.; GERMANIDIS, G.; FRAINAI, P-O.; DELÉAGE, G.; PAWLOTSKY, J-M. Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *Journal of virology* 75 (12): 5703-5710, 2001.
- PENIN, F.; DUBUISSON, J.; REY, F.A.; MORADPOUR, D.; PAWLOTSKY, J-M. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39 (1): 5-19, 2004.
- PEREZ, R.M.; FERRAZ, M.L.G.; FIGUEIREDO, M.S.; CONTADO, D.; KOIDE, S.; FERREIRA, A.P.; NETO, M.C.; PESTANA, J.O.M.; SILVA, A.E.B. Unexpected distribution of hepatitis C virus genotypes in patients on hemodialysis and kidney transplant recipients. *Journal of Medical Virology* 69: 489-494, 2003.
- POLYAK, S.J.; KHABAR, K.S.A.; PASCHAL, D.M.; EZELLE, H.J.; DUVERLIE, G.; BARBER, G.N.; LEVY, D.E.; MUKAIDA, N.; GRETCH, D.R. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *Journal of Virology* 75 (13): 6095-6106, 2001.
- PUOTI, C. Hepatitis C virus with normal transaminase levels. *Digestive Disease* 25: 277-278, 2007.
- QIN, H.; SHIRE, N.J.; KEENAN, E.D.; ROUSTER, S.D.; EYSTER, M.E.; GOEDERT, J.J.; KOZIEL, M.J.; SHERMAN, K.E.; THE MULTICENTER HEMOPHILIA COHORT STUDY GROUP. HCV *quasispecies* evolution: association with progression to end-stage liver disease in hemophiliacs infected with HCV or HCV/HIV. *Blood* 105 (2): 533-541, 2005.

- RAHNAVARDI, M.; MOGHADDAM, S.M.H.; ALAVIAN, S.M. Hepatitis C in hemodialysis patients: Current global magnitude, natural history, diagnostic difficulties, and preventive measures. *American Journal of Nephrology* 28: 628-640, 2008.
- REHERMANN, B. Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. *Seminars in Liver Disease* 20 (2): 127-141, 2000.
- RICHTER, S.S. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (12): 4407-4412. 2002.
- RODÉS, J. & TAPIAS, J.M.S. Hepatitis C. *Nephrology Dialysis Transplantation* 15 (Suppl.8): 2-11, 2000.
- ROSEN, H.R. Hepatitis C pathogenesis: Mechanisms of viral clearance and liver injury. *Liver Transplantation* 9 (11) (Suppl.3): S35-S43, 2003.
- RUSSO, M.W.; GHOLDSWEIG, C.D.; JACOBSON, I.M.; BROWN, R.S. Interferon monotherapy for dialysis patients with chronic hepatitis C: An analysis of the literature on efficacy and safety. *The American Journal of Gastroenterology* 98 (7): 1611-1615, 2003.
- RUSTIG, V.K. The epidemiology of hepatitis C infection in the United States. *Journal of Gastroenterology* 42 (7): 513-521, 2007.
- SANDRES-SAUNÉ, K.; DENY, P.; PASQUIER, C.; THIBAUT, V.; DUVERLIE, G.; IZOPET, J. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5B region. *Journal of Virology Methods* 109: 187-193, 2003.
- SANTANA, G.O.; COTRIM, H.P.; MOTA, E.; PARANÁ, R.; SANTANA, N.P.; LYRA, L. Anticorpo contra o vírus C da hepatite em pacientes sob programa de hemodiálise em Salvador, Ba, Brasil. *Arquivos de Gastroenterologia* 38 (1): 24-31, 2001.
- SANTOS, M.A & SOUTO, F.J. Infection by the hepatitis C virus in chronic renal failure patients undergoing hemodialysis in Mato Grosso state, Central Brazil: a cohort study. *BMC Public Health* 7: 32, 2007.
- SÈNE, D.; LIMAL, N.; CACOUB, P. Hepatitis C virus-associated extrahepatic manifestations: a review. *Metabolic Brain Disease* 19 (3/4): 357-381, 2004.
- SCOTT, J.D. & GRETCH, D.R. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection. A systematic review. *JAMA* 297 (7): 724-732, 2007.
- SHEPARD, C.W.; FINELLI, L.; ALTER, M.J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infectious Diseases* 5: 558-567, 2005.
- SHERIDAN, I.; PYBUS, O.G.; HOLMES, E.C.; KLENERMAN, P. High-resolution

- phylogenetic analysis of hepatitis C virus adaptation and its relationship to disease progression. *Journal of Virology* 78 (7): 3447-3454, 2004.
- SHERMAN, K.E.; ANDREATTA, C.; O'BRIEN, J.; GUTIERREZ, A.; HARRIS, R. Hepatitis C in human immunodeficiency virus-coinfected patients: Increased variability in the hypervariable envelope coding domain. *Hepatology* 23 (4): 688-694, 1996.
- SILVA, L.K.; SILVA, M.B.S.; RODART, I.F.; LOPES, G.B.; COSTA, F.Q.; MELO, M.E.; GUSMÃO, E.; REIS, M.G. Prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV genotypes of hemodialysis patients in Salvador, Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 39: 595-602, 2006.
- SILVA, C.M.; COSTI, C.; KRUG, L.P.; RAMOS, A.B.; GRANDI, T.; GANDOLFI, V.L.; MENEZES, M.E.; OCAMPOS, M.; NIEL, C.; ROSSETTI, M.L. High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 102 (7): 867-870, 2007.
- SIMMONDS, P.; ALBERTI, A.; ALETR, J.; BONINO, F.; BRADLEY, W.; BRECHOT, C.; BROUWER, T.; CHAN, S.; CHAYAMA, K.; CHEN, D.; CHOO, Q.; COLOMBO, M.; CUYPERS, H.T.M.; DATE, T.; DUSHEIKO, G.M.; ESTEBAN, J.I.; FAY, O.; HADZIYANNIS, S.J.; HAN, J.; HATZAKIS, A.; HOLMES, E.C.; HOTTA, H.; HOUGHTON, M.; IRVINE, B.; KOHARA, M.; KOLBERG, J.A.; KUO, G.; LAU, J.Y.N.; LELIE, P.N.; MAERTENS, G.; MCOMISH, F.; MIYAMURA, T.; MIZOKAMI, M.; NOMOTO, A.; PRINCE, A.M.; REEESINK, H.W.; RICE, C.; ROGGEENDORF, M.; SCHALM, S.W.; SHIBATA, T.; SHIMOTOHNO, K.; STUYVER, L.; TRÉPO, C.; WEINER, A.; YAP, P.L., URDEA, M.S. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 19: (5) 1321-1324, 1994.
- SIMMONDS, P.; BUKH, J.; COMBET, C.; DELÉAGE, G.; ENOMOTO, N.; FEINSTONE, S.; HALFON, P.; INCHAUSPÉ, G.; KUIKEN, C.; MAERTENS, G.; MIZOKAMI, M.; MURPHY, D.G.; OKAMOTO, H.; PAWLOTSKY, J.-M.; PENIN, F.; SABLON, E.; SHIN-I, T.; STUYVER, L.J.; THIEL, H.-J.; VIAZOV, S.; WEINER, A.J.; WIDELL, A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42 (4): 962-973, 2005.
- SOBOLEV, B.N.; POROIKOV, V.V.; OLENINA, L.V.; KOLESANOVA, E.F.; ARCHAKOV, A.I. Comparative analysis of amino acid sequences from

- envelope proteins isolated from different hepatitis C virus variants: possible role of conservative and variable regions. *Journal of Viral Hepatitis* 7: 368-374, 2000.
- SOUZA, K.P.; LUZ, J.A.; TELES, S.A.; CARNEIRO, M.A.S.; OLIVEIRA, L.A.; GOMES, A.S.; DIAS, M.A.; GOMES, S.A.; YOSHIDA, C.F.T.; MARTINS, R.M.B. Hepatitis B and C in the hemodialysis unit of Tocantins, Brazil: Serological and molecular profiles. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 98 (5): 599-603, 2003.
- SULOWICZ, W.; RADZISZEWSKI, A.; CHOWANIEC, E. Hepatitis C virus infection in dialysis patients. *Hemodialysis International* 11: 286-295. 2007.
- SY, T. & JAMAL, M. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *International Journal of Medical Sciences* 3 (2): 41-46, 2006.
- TAYLOR, D.R.; SHI, S.T.; ROMANO, P.R.; BARBER, G.N.; LAI, M.M.C. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285: 107-110, 1999.
- TERRAULT, N.A. & ADEY, D.B. The kidney transplant recipient with hepatitis C infection: Pre-and posttransplantation treatment. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2: 563-575, 2007.
- THIMME, R.; LOHMANN, V.; WEBER, F. A target on the move: Innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Research* 69: 129-141, 2006.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673 – 4680, 1994.
- TIMM, J. & ROGGENDORF, M. Sequence diversity of hepatitis C virus: Implications for immune control and therapy. *World Journal of Gastroenterology* 13 (36): 4808-4817. 2007.
- TREVIZOLI, J.E. Aspectos epidemiológicos da hepatite C em pacientes portadores de insuficiência renal crônica submetidos à hemodiálise. *Dissertação de Mestrado*. Pp.98, 2004.
- TREVIZOLI, J.E.; DE PAULA, R.M.; RIBEIRO, L.F.R.; AMORIM, R.M.S.; DE CARVALHO, M.B.; MENDES, L.S.; NETO, C.J.; DE DEUS, J.R.M.; DE ASSIS, F.; NEVES, R. Hepatitis C is less aggressive in hemodialysis patients than in nonuremic patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3 (5): 1385-1390, 2008.

- TROESCH, M.; MEUNIER, I.; LAPIERRE, P.; LAPOINTE, N.; ALVAREZ, F.; BOUCHER, M.; SOUDEYNS, H. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology* 352: 357-367, 2006.
- VANDERBORGHT, B.O.M.; ROUZERE, C.; GINUINI, C.F.; MAERTENS, G.; VAN HEUVERSWYN, H.; YOSHIDA, C.F.T. High prevalence of hepatitis C infection among brazilian hemodialysis patients in Rio de Janeiro: a one-year follow-up study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 37 (1): 75-79, 1995.
- XU, Z.; CHOI, J.; YEN, T.S.B.; LU, W.; STROHECKER, A.; GOVINDARAJAN, S.; CHIEN, D.; SELBY, M.J.; OU, J-h. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *The EMBO Journal* 20 (14): 3840-3848, 2001.
- ZARIFE, M.A. ;SILVA, I.K.;SILVA, M.B.;LOPES, G.B.; BARRETO, M.I.; TEIXEIRA, M.G.; DOURADO, I.; REIS, M.G. Prevalence of hepatitis C virus infection in north-eastern Brazil: a population-based study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100 (7): 663-668, 2006.
- ZEIN, N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clinical Microbiology Reviews* 13 (2): 223-235, 2000.
- ZEIN, C.O. & ZEIN, N.N. Advances in therapy for hepatitis C infection . *Microbes and Infection* 4: 1237-1246, 2002.
- ZEISEL, M.B.; FAFI-KREMER, S.; FOFANA, I.; BARTH, H.; STOLL-KELLER, F.; DOFFOËL, M.; BAUMERT, T.F. Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology* 13 (36): 4824-4830, 2007.
- WALEWSKI, J.L.; KELLER, T.R.; STUMP, D.D.; BRANCH, A.D. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 7: 710-721, 2001.

8. ANEXOS

HCV genotypes in hemodialysis patients. Amorim, R.M.S. *et al.*

**HEPATITIS C VIRUS GENOTYPES AMONG HEMODIALYSIS
PATIENTS IN THE FEDERAL DISTRICT, BRAZIL**

**Regina M.S. Amorim¹; Tainá Raiol¹; José E. Trevisoli²; Francisco A.R. Neves²;
Cláudia R. F. Martins¹; Regina M. B. Martins^{3*}**

¹Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil;

²Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil;

³Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

*Corresponding Author. Mailing address: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Caixa Postal 131. 74605-050. Goiânia, GO, Brasil. [Tel: +55 62 32096129](tel:+556232096129). Fax: +55 62 32096363. E-mail: rbringel@terra.com.br

SHORT COMMUNICATION

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) genotypes were determined in hemodialysis patients in the Federal District, Brazil. By sequencing of the 5' NC region, genotypes 1 and 3: subtypes 1a (82.3%), 1b (5.9%), 1a/1b (2.0%), and 3a (9.8%); and in the NS5B region, subtypes 1a (90.5%) and 3a (9.5%) were found. The two regions yielded concordant results for HCV genotypes and subtypes in 100% and 95.2%, respectively.

Key words: Hepatitis C virus, hemodialysis, genotypes

RESUMO

Genótipos do vírus da hepatite C em pacientes em hemodiálise no Distrito Federal, Brasil

Os genótipos do vírus da hepatite C (HCV) foram determinados em pacientes em hemodiálise no Distrito Federal, Brasil. Pelo sequenciamento da região 5' NC, os genótipos 1 e 3: subtipos 1a (82,3%), 1b (5,9%), 1a/1b (2,0%) e 3a (9,8%); e na região NS5B, subtipos 1a (90,5%) e 3a (9,5%) foram encontrados. As duas regiões forneceram resultados concordantes para os genótipos e subtipos em 100% e 95,2%, respectivamente.

Palavras-chave: Vírus da hepatite C, hemodiálise, genótipos

Hemodialysis patients are at high risk of acquiring hepatitis C virus (HCV) infection. These patients have an increased tendency to become HCV chronic carriers and also to be a potential reservoir for its transmission, possibly contributing to the nosocomial spread of HCV in dialysis centers (5,13). In addition, hepatitis C seems to increase the mortality rate in this group of patients (4,20).

Based on the nucleotide (nt) sequence divergence, HCV is classified into six major genetic groups designated genotypes (1 to 6), each comprising multiple subtypes (designated a, b, c, etc). These genotypes and subtypes have distinct geographical distributions. Genotype determination is a relevant predictive parameter of the response to antiviral treatment. Information on subtype distribution is needed to perform effective HCV molecular and epidemiological surveillance, modes of transmission, and further vaccine development efforts (22).

In order to determine HCV genotypes and subtypes, the choice of the genome region to be analyzed is crucial. This region must present genotype-specific and subtype-specific motifs. Additionally it must be highly conserved to be detected by most of the assays based on nucleic acid amplification. Several assays were developed to identify HCV genotypes and subtypes from the 5' noncoding (NC) region because this region is readily amplified by PCR. On the other hand, this region does not contain sufficient information to resolve subtypes. Thus, only sequence analysis of the protein-coding regions such as core, envelope (E1) or nonstructural 5B (NS5B) of HCV genome is efficient in discriminating among subtypes (8,14,22).

In Brazil, a country of continental dimensions, the distribution of HCV genotypes and subtypes among hemodialysis patients has not been well documented. The studies

carried out in São Paulo (15,16,19), Rio de Janeiro (3), Belo Horizonte (7), Recife (1), Tocantins (23), Goiás (8) and Campo Grande (10) have shown that genotype 1, subtype 1a, was prevalent in those patients. However, the genotyping methods employed in the majority of those studies (except in Goiás state), which were based on 5' NC region analyses, did not permit the correct identification of HCV subtypes. In the Federal District, Brazil, there is no data about the genetic diversity of HCV isolates in these patients. In the present study, the HCV genotypes and subtypes were determined in hemodialysis patients in the Federal District, Brazil, by nucleotide sequencing analysis of the 5' NC and NS5B regions.

The study was carried out in all seven dialysis units in the Federal District, Central Brazil. Between January and May 2002, blood samples were collected from 761 chronic hemodialysis patients (nearly 86% of this population) and serum samples were screened for anti-HCV by a third-generation enzyme-linked immunoassay (Abbott PrismR, Chicago, IL, USA). The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Health Department of the Federal District, and written informed consent was obtained from each patient.

Sixty-six anti-HCV positive samples were subjected to RNA extraction by the commercially standardized reagents (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions, followed by reverse transcription, as described by Ginabreda et al. (11). cDNA was amplified using the primers complementary to the conserved area of the 5' NC and NS5B regions and PCR conditions described by Ginabreda et al. (11) and Sandres-Sauné et al. (21), respectively.

HCV genotyping was determined in all HCV-RNA-positive samples by analyzing sequences of the 5' NC and NS5B regions. The nested RT-PCR products were purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen - GmbH, Hilden, Germany) and submitted to a direct nucleotide sequencing reaction using a Big Dye Terminator kit (version 3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and analyzed with the ABI 3730 automated DNA sequencer. For 5' NC region, the sequence from nucleotide -257 to nucleotide -51 was used for analysis and genotyping. For NS5B region, the sequence from nucleotide 8279 to nucleotide 8606 was used for analysis and genotyping was performed by phylogenetic analysis using reference sequences retrieved from GenBank. The homology among HCV sequences from the Federal District and those already deposited at HCV Databases was analyzed using the HCV-Blast program (available at <http://hcv.lanl.gov>). The phylogenetic tree was constructed with PHYLIP version 3.6 software (9) using the neighbor-joining method and the Kimura-two parameter, and its reliability was assessed by bootstrap resampling (1000 pseudo-replicas). To avoid cross-contamination between samples, standard precautions were used in all manipulations. Separate areas were used for reagents, samples and manipulation of amplified products.

The HCV RNA was detected in 51 samples by RT-nested PCR of the 5'NC region. Direct nucleotide sequencing of 207 nt from the 5' NC region was performed in all HCV RNA-positive samples. Among them, 90.2% were of genotype 1, subtypes 1a (82.3%), 1b (5.9%) and 1a/1b (2.0%). The remaining samples (9.8%) belonged to genotype 3, subtype 3a (Table 1).

Of the 51 HCV RNA-positive samples, 42 (82.3%) samples could be amplified and sequenced in the NS5B region. Using phylogenetic tree analysis of this region 328 nt,

38 sequences (90.5%) were classified as genotype 1, subtype 1a. All genotype 3 sequences (n = 4; 9.5%) were grouped inside the clad of subtype 3a of the phylogenetic tree (Figure 1 and Table 1).

For the 42 samples which were genotyped by sequencing of the two regions, the genotypes and subtypes determined were concordant in 100% and 95.2% of cases, respectively. Two samples showed discrepant results. These samples (subtype 1b by the analysis of the 5' NC region) were identified as 1a by sequence analysis of the NS5B region. In addition, the 9 samples which were amplified and sequenced in the 5'NC region, but not in the NS5B region, were of subtype 1a (n = 6), 1b (n = 1), 1a/1b (n = 1) and 3a (n = 1).

The distribution of HCV genotypes in the study population, with a predominance of subtype 1a (90.5%) followed by 3a (9.5%), differs from that of local blood donors, in which subtypes 3a (39.1%), 1a (34.1%) and 1b (26.8%) were detected (2). However, the predominance of genotype 1, subtype 1a was also found in other Brazilian studies carried out among hemodialysis patients (1,8,10,15,16,19,23). These data suggest that subtype 1a is more likely to disseminate in the hemodialysis environment or could be more adapted to the immunosuppression of these patients (19).

In the present study, all 51 HCV RNA-positive samples were genotyped by sequence analysis of the 5' NC region. Of these, 9 (17.7%) could not be genotyped by NS5B sequence analysis due to failure of the amplification procedure despite successive attempts to amplify cDNA with the NS5B primers. Although these primers are thought to bind highly conserved sequences (21), primer-target mismatching within the NS5B region is still likely because the relative variability of its sequence that may not always be

recognized by the used primers. Despite this inability to amplify all HCV RNA positive samples, NS5B sequence analysis was used here as a reference method for accurate genotyping (8,21).

As observed by other authors (6,8,12,18), no difference at the genotype level was found for the 42 samples that could be successfully amplified and sequenced in the the 5' NC and NS5B regions. Also, in accordance with previous studies (6,8,12,14,17,18,21), discrepant results at the subtype level, mainly subtypes 1a and 1b, were found here (two samples identified as 1a by NS5B sequencing were subtyped as 1b by 5' NC sequencing). Although both regions provide similar results at the genotype level, which is adequate for clinical practice, especially in the management of antiviral therapy, the NS5B sequencing appears to be more useful for epidemiological investigations.

In conclusion, by means of 5'NC and NS5B sequence analysis, this study demonstrates that HCV subtype 1a is the most prevalent among hemodialysis patients in the Federal District, Brazil. In addition, the results presented here highlight that 5' NC and NS5B regions provide similar HCV genotyping results at the genotype level, which is adequate for clinical purposes, but direct sequencing of the NS5B region is more reliable for HCV subtype identification required in epidemiological studies.

REFERENCES

1. *Albuquerque, A.C.C.; Coêlho, M.R.C.D.; Lopes, E.P.A.; Lemos, M.F.; Moreira, R.C. (2005). Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients from one center in Recife, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 100, 467-470.*

2. Amorim, R.M.; Oliveira, C.P.; Wyant, P.S.; Cerqueira, D.M.; Câmara, G.N.; Flores, L.S.; Martins, R.M.; Martins, C.R. (2004). *Hepatitis C virus genotypes in blood donors from the Federal District, Central Brazil*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 99, 895-897.
3. Azevedo, H.A.; Villela-Nogueira, C.A.; Perez, R.M.; Segadas-Soares, J.A.; Takahashi, C.; Gaburo, N.; Pessoa, I.; Coelho, H.S. (2007). Similar HCV viral load levels and genotype distribution among end-stage renal disease patients on hemodialysis and HCV-infected patients with normal renal function. [*J. Nephrol.*](#), 20, 609-616.
4. Baid-Agrawal, S.; Pascual, M.; Moradpour, D.; Frei, U.; Tolckoff-Rubin, N. (2008). Hepatitis C virus infection in haemodialysis and kidney transplant patients. [*Rev. Med. Virol.*](#), 18, 97-115.
5. Carneiro, M.A.; Teles, S.A.; Lampe, E.; Espírito-Santo, MP.; Gouveia-Oliveira, R.; Reis, N.R.; Yoshida, C.F.; Martins, R.M. (2007). *Molecular and epidemiological study on nosocomial transmission of HCV in hemodialysis patients in Brazil*. *J. Med. Virol.*, 79, 1325-1333.
6. Chen, Z.; Weck, K.E. (2002). Hepatitis C virus genotyping: interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3127-3134.
7. de Paula Farah K, Carmo, R.A.; de Figueiredo Antunes C.M.; Serufo, J.C.; Nobre Júnior, V.A.; Fonseca de Castro, L.P.; Leite, V.H.; Silva, R.A.; Alvares, MC.; Corrêa, G.O.; Busek, S.C.; Lambertucci, J.R. (2007). Hepatitis C, HCV genotypes and hepatic siderosis in patients with chronic renal failure on haemodialysis in Brazil. [*Nephrol. Dial. Transplant.*](#), 22, 2027-2031

8. Espírito-Santo, M.P.; Carneiro, M.A.S.; Reis, N.R.S.; Kozłowski, A.G.; Teles, S.A.; Lampe, E.; Yoshida, C.F.T.; Martins, R.M.B. (2007). Genotyping hepatitis C virus from hemodialysis patients in Central Brazil by line probe assay and sequence analysis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 40, 545-550.
9. [Felsenstein, J. \(1981\)](#). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 17, 368-376.
10. Freitas, S.Z.; da Cunha, R.V.; Martins, R.M.; Teles, S.A.; Ibanhes, M.L.; Motta-Castro, A.R. (2008). Prevalence, genotypes and risk factors associated with hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in Campo Grande, MS, Brazil. [Mem. Inst. Oswaldo Cruz](#), 103, 405-408.
11. Ginabreda, M.G.; Yoshida, C.F.; Niel, C. (1997). Genomic characterization of Brazilian hepatitis C virus genotypes 1a and 1b. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30, 339-345.
12. Halfon, P.; Trimoulet, P.; Bourliere, M.; Khiri, H.; de Lédighen, V.; Couzigou, P.; Feryn, J.M.; Alcaraz, P.; Renou, C.; Fleury, H.J.; Ouzan, D. (2001). Hepatitis C virus genotyping based on 5' noncoding sequence analysis (Trugene). *J. Clin. Microbiol.*, 39, 1771-1773.
13. Lampe, E.; Yoshida, C.F.; De Oliveira, R.V.; Lauer, G.M.; Lewis-Ximenez, L.L. (2008). Molecular analysis and patterns of ALT and hepatitis C virus seroconversion in haemodialysis patients with acute hepatitis. [Nephrology](#) 13, 186-192.
14. Laperche, S.; Lunel, F.; Izopet, J.; Alain, S.; Dény, P.; Duverlie, G.; Gaudy, C.; Pawlotsky, J.M.; Plantier, J.C.; Pozzetto, B.; Thibault, V.; Tosetti, F.; Lefrère, J.J.

- (2005). Comparison of hepatitis C virus NS5b and 5' noncoding gene sequencing methods in a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 733-739.
15. Lemos, L.B.; Perez, R.M.; Matos, C.A.; Silva, I.S.; Silva, A.E.; Ferraz, M.L. (2008). Clinical and laboratory characteristics of acute hepatitis C in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *J. Clin. Gastroenterol.*, 42, 208-211.
16. *Moreira, R.; Pinho, J.R.R.; Fares, J.; Oba, I.T.; Cardoso, M.R.; Saraceni, C.P.; Granato, C. (2003). Prospective study of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients by monthly analysis of HCV RNA and antibodies. Can. J. Microbiol.*, 49, 503-507.
17. Nolte, F.S.; Green, A.M.; Fiebelkorn, K.R.; Caliendo, A.M.; Sturchio, C.; Grunwald, A.; Healy, M. (2003). Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on analysis of the 5' noncoding region. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 1558-1564.
18. Othman, S.B.; Trabelsi, A.; Monnet, A.; Bouzgarrou, N.; Grattard, F.; Beyou, A.; Bourlet, T.; Pozzetto, B. (2004). Evaluation of a prototype HCV NS5b assay for typing strains of hepatitis C virus isolated from Tunisian haemodialysis patients. *J. Virol. Methods.*, 119, 177-181.
19. *Perez, R.M.; Ferraz, M.L.; Figueiredo, M.S.; Contado, D.; Koide, S.; Ferreira, A.P.; Cendoroglo Neto, M.; Medina Pestana, J.O.; Silva, A.E. (2003). Unexpected distribution of hepatitis C virus genotypes in patients on hemodialysis and kidney transplant recipients. J. Med. Virol.*, 69, 489-494.
20. Rahnavardi, M.; Hosseini Moghaddam, S.M.; Alavian, S.M. (2008). Hepatitis C in hemodialysis patients: current global magnitude, natural history, diagnostic

- difficulties, and preventive measures. [Am. J. Nephrol.](#), 28, 628-640.
21. Sandres-Sauné, K.; Deny, P.; Pasquier, C.; Thibaut, V.; Duverlie, G.; Izopet, J. (2003). Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *J. Virol. Methods.*, 109, 187-193.
22. Simmonds, P.; Bukh, J.; Combet, C.; Deléage, G.; Enomoto, N.; Feinstone, S.; Halfon, P.; Inchauspé, G.; Kuiken, C.; Maertens, G.; Mizokami, M.; Murphy, D.G.; Okamoto, H.; Pawlotsky, J.M.; Penin, F.; Sablon, E.; Shin-I, T. Stuyver, L.J.; Thiel, H.J.; Viazov, S.; Weiner, A.J.; Widell, A. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. [Hepatology](#), 42, 962-973.
23. Souza, K.P.; Luz, J.A.; Teles, S.A.; Carneiro, M.A.S.; Oliveira, L.A.; Gomes, A.S.; Dias, M.A.; Gomes, S.A.; Yoshida, C.F.T.; Martins, R.M.B. (2003). Hepatitis B and C in the hemodialysis unit of Tocantins, Brazil: serological and molecular profiles. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98, 599-603.

Table 1. Distribution of hepatitis C virus subtypes isolated from hemodialysis patients in the Federal District using the 5' noncoding (NC) and nonstructural 5B (NS5B) regions sequencing

Region/Subtype	N	Frequency (%)
5' NC (N = 51)		
1a	42	82.3
1b	3	5.9
1a/1b	1	2.0
3a	5	9.8
NS5B (N = 42)		
1a	38	90.5
1b	0	0
3a	4	9.5

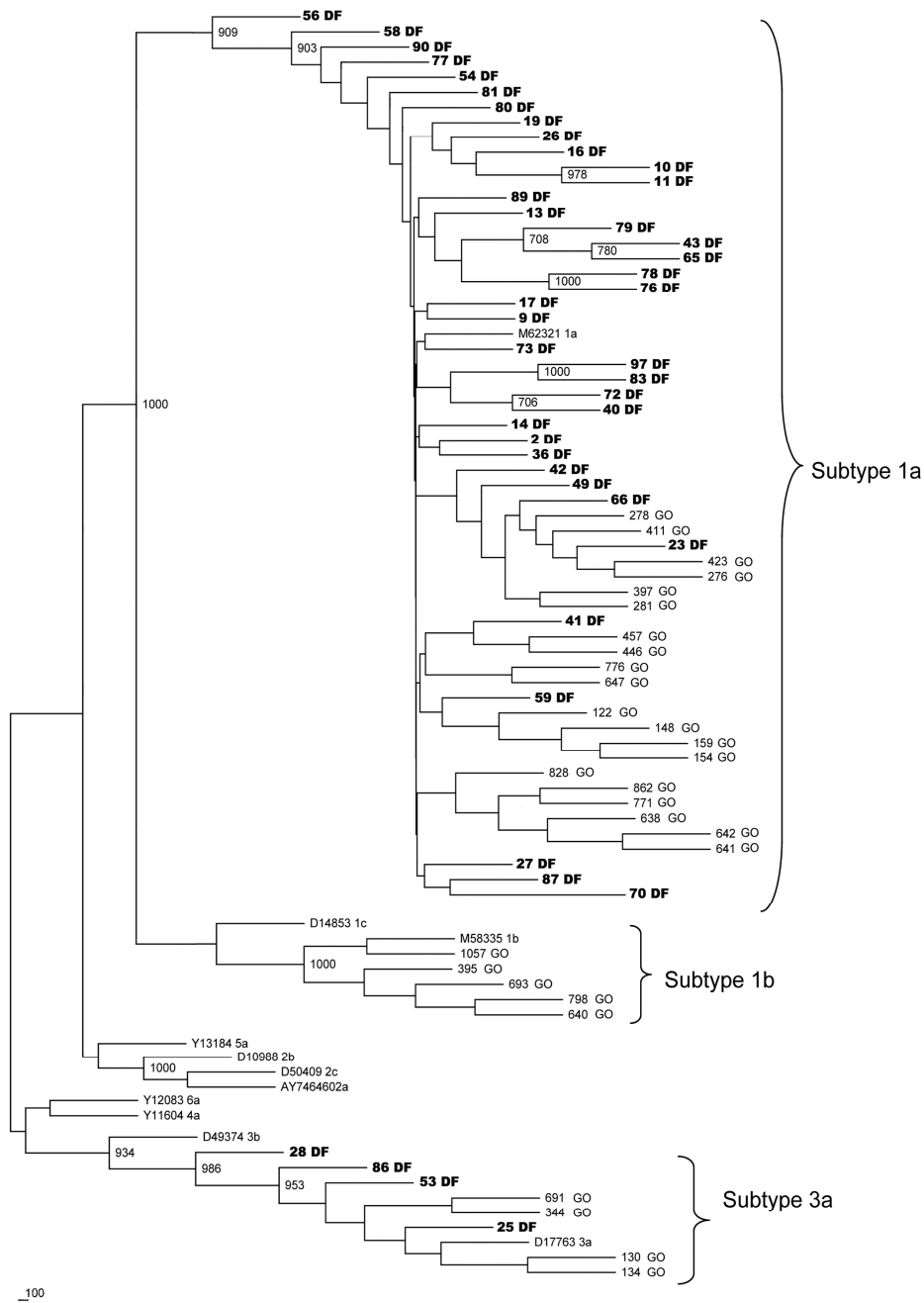


Figure 1. Phylogenetic three analysis of the NS5B region of HCV genome of 42 isolates from hemodialysis patients in the Federal District, 11 references sequences of main HCV subtypes and 28 sequences from hemodialysis patients in Goiás state (GO). Strains belonging to this study are shown in bold and designated by their number and DF, and the references sequences used are: M62321-1a, M58335-1b, D14853-1c, AY746460-2a, D10988-2b, D50409-2c, D17763-3a, D49374-3b, Y11604-4a, Y13184-5a, Y12083-6a.